

⑩ 日本国特許庁 (JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭57—209297

⑬ Int. Cl.³

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和57年(1982)12月22日

C 07 H 19/06

7252—4C

19/14

7252—4C

19/20

7252—4C

21/02

7252—4C

21/04

7252—4C

C 12 P 19/34

6712—4B

C 12 Q 1/00

6543—4B

// C 12 N 15/00

7235—4B

C 12 R 1/19

※

(全 40 頁)

⑮ 変性ヌクレオチドおよび該ヌクレオチドの製造と使用の方法

アメリカ合衆国06437コネティカット・ギルフォード・ペドラーズ・ロード40

⑯ 特 願 昭57—64611

⑰ 出 願 人 エール・ユニバーシティ

⑱ 出 願 昭57(1982)4月16日

アメリカ合衆国コネティカット・ニュー・ヘブン(番地なし)

優先権主張 ⑲1981年4月17日⑳米国(US)

㉑255223

㉒代 理 人 弁理士 宇佐見忠男

㉓発 明 者 デイビッド・シー・ウオード

最終頁に続く

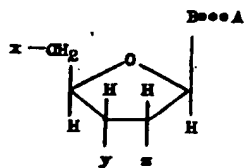
明 細 書

1. 発明の名称

変性ヌクレオチドおよび該ヌクレオチドの製造と使用の方法

2. 特許請求の範囲

1. 構造式



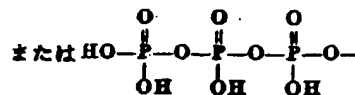
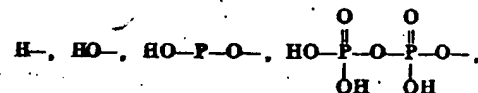
ここにBは糖部分のO¹位置に共有的に結合されたプリン、7-デアザプリンまたはピリミジン部分を表わし、Bがプリンまたは7-デアザプリンの時、該結合は該プリンまたはデアザプリンのN¹位置に存し、Bがピリミジンの時、該結合はN¹位置に存するものと規定せられ、

Aは本化合物が二重螺旋構造のポリ核酸、

デオキシリボ核酸複合体、またはDNA—RNA交配物中に取り入れられた時、ポリヌクレオチドと共に検知され得る錯体を形成することの出来る少くとも3個の炭素原子からなる部分を表わし、

点線はBとAとからなる結合または組を表わし、もしBがプリンであれば該結合は該プリンの8-位置に存し、もしBが7-デアザプリンであれば該結合は該デアザプリンの7-位置に存し、そしてもしBがピリミジンであれば該結合は該ピリミジンの5-位置に存するものと規定せられ、

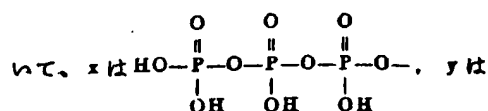
そしてX、YおよびZの各々は



を表わす。

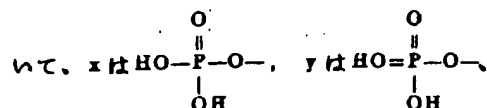
を有する化合物。

- 2 「特許請求の範囲 1.」に記載の化合物において、Bはウラシル、シトシン、デアザアデニン、またはデアザグアニンである。
- 3 「特許請求の範囲 1.」に記載の化合物において、Aはハブタンである。
- 4 「特許請求の範囲 1.」に記載の化合物において、Aはリガンドである。
- 5 「特許請求の範囲 1.」に記載の化合物において、Aはピオチンである。
- 6 「特許請求の範囲 1.」に記載の化合物において、Aはイミノピオチンである。
- 7 「特許請求の範囲 1.」に記載の化合物において、Aは少くとも 5 個の炭素原子を有する有機部分である。
- 8 「特許請求の範囲 1.」に記載の化合物において、Aは非芳香性有機部分である。
- 9 「特許請求の範囲 1.」に記載の化合物において、点線によって表わされる化学結合は B に関連して α -位置に存するオレフィン結合を含む。
- 10 「特許請求の範囲 1.」に記載の化合物において、該化学結合は $-\text{CH}_2-\text{NH}-$ 部分を含む。
- 11 「特許請求の範囲 2.」に記載の化合物において、該オレフィン結合は $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{NH}-$ である。
- 12 「特許請求の範囲 2.」に記載の化合物において、該オレフィン結合は $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{O}-\underset{\text{OH}}{\text{CH}_2}-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{NH}-$ である。
- 13 「特許請求の範囲 1.」に記載の化合物において、該化学結合は $-\text{B}-, -\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{O}-, \text{および} -\text{O}-$ からなる組から選ばれるかまたは該組から選ばれた部分を含む。
- 14 「特許請求の範囲 1.」に記載の化合物において、xは $\text{HO}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{P}-\text{O}-, \text{yはHO}-, \text{そして} z \text{はHO}-$ である。
- 15 「特許請求の範囲 1.」に記載の化合物において、xは $\text{HO}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{P}-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{P}-\text{O}-, \text{yはHO}-, \text{そして} z \text{はHO}-$ である。
- 16 「特許請求の範囲 1.」に記載の化合物において、xは $\text{HO}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{P}-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{P}-\text{O}-, \text{yはHO}-, \text{そして} z \text{はH}-$ である。
- 17 「特許請求の範囲 1.」に記載の化合物において、xは $\text{HO}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{P}-\text{O}-, \text{yはHO}-, \text{そして} z \text{はH}-$ である。
- 18 「特許請求の範囲 1.」に記載の化合物において、xは $\text{HO}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{P}-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{P}-\text{O}-, \text{yはHO}-, \text{そして} z \text{はH}-$ である。
- 19 「特許請求の範囲 1.」に記載の化合物において、



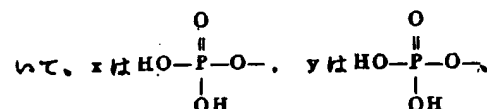
HO—、そしてzはH—である。

20. 「特許請求の範囲1。」に記載の化合物にお



そしてzはHO—である。

21. 「特許請求の範囲1。」に記載の化合物にお

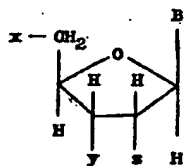


そしてzはH—である。

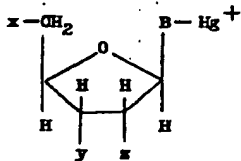
22. 「特許請求の範囲14.15.16.17.18.19.

20.、もしくは21。」のいずれにも記載の化合物において、Aはピオチンである。

27. (a) 構造式



を有する化合物と水銀塩とを適当な溶液中で適当な条件下において反応せしめて構造式



を有する水銀化合物を形成すること。

(b) 上記水銀化合物を該水銀化合物の—Hg⁺部分と反応し得、そして式・・・Nによって表わされる化学部分と反応せしめると、上記反応は水性溶液中で、そしてK₂PdO₁₄の存在下に、適当な条件下に

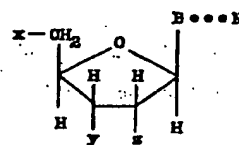
23. 「特許請求の範囲14.15.16.17.18.19.20.、もしくは21。」のいずれにも記載の化合物において、Aはイミノピオチンである。

24. 「特許請求の範囲14.15.16.17.18.19.20.21.22.、もしくは23。」のいずれにも記載の化合物において、該化学結合は—CH=CH—CH₂—NH—である。

25. 「特許請求の範囲14.15.16.17.18.19.20.21.22.、または23。」のいずれにも記載の化合物において、該化学結合は—CH=CH—CH₂—O—CH₂—CH—CH₂—NH—
OH
である。

26. 「特許請求の範囲14.15.16.17.18.19.20.21.22.23.24.、もしくは25。」のいずれにも記載の化合物において、Bはウラシルである。

において行われ、構造式



ここにNは反応性末端官能基もしくはAである。

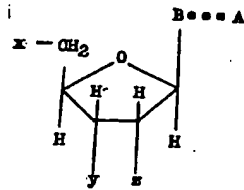
を有する化合物を形成する。

そして

(c) 該化合物を上記変性ヌクレオチドとして回収すること、NがAの時またはNが反応性末端基の時、該化合物は構造式M—Aを有する化合物、ここにMはNと反応可能な官能基を表わす、と水性溶液中適当な条件下において反応せしめられて上記変性ヌクレオチドを形成し、それから該変性ヌクレオチドが回収せられる。

以上の段階からなる。

構造式



ことにBは糖部分のC¹—位置に共有的に結合されたプリン、7—デアソプリンまたはピリミジン部分を変わし、Bがプリンまたは7—デアソプリンの時、該結合は該プリンまたはデアソプリンのN⁹—位置に存し、Bがピリミジンの時、該結合はN¹—位置に存するものと規定せられ、

Aは本化合物が二重螺旋構造のリボ核酸、デオキシリボ核酸複合体、またはDNA—RNA交配物中に取り入れられた時、ポリペプチドと共に検知され得る錯体を形成することの出来る少くとも3個の炭素原子からなる部分を変わし、
点線はBとAとからなる結合または組を表

範囲である。

29. 「特許請求の範囲2.7.」に記載の方法において、該水銀塩は酢酸水銀である。

30. 「特許請求の範囲2.7.」に記載の方法において、式・・・Nによって表わされる該化学部分は—CH₂=CH—CH₂—NH₂である。

31. 「特許請求の範囲2.7.」に記載の方法において、式・・・Nによって表わされる該化学部分は

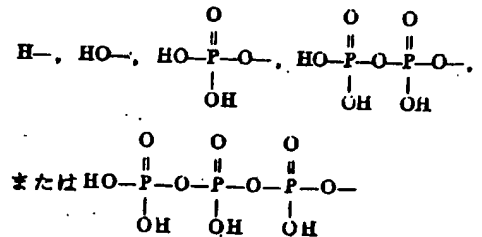
$$\text{—CH}_2\text{=CH—CH}_2\text{—O—CH}_2\text{—CH—CH}_2\text{—NH}_2$$

$$\text{OH}$$
 である。

32. 「特許請求の範囲2.7.」に記載の方法において、該水性溶媒はバッファーを含む。

33. 「特許請求の範囲3.2.」に記載の方法にお

わし、もしBがプリンであれば該結合は該プリンの8—位置に存し、もしBが7—デアソプリンであれば該結合は該デアソプリンの7—位置に存し、そしてもしBがピリミジンであれば該結合は該ピリミジンの5—位置に存するものと規定せられ、そしてx、yおよびzの各々は



を表わす。

を有する変性ヌクレオチドの製造方法。

28. 「特許請求の範囲2.7.」に記載の方法において、該適当な条件はpHは約1から14の範囲であり、温度は5°から100°Cの範囲であり、そして反応時間は約3から24時間の

いて、該バッファーは酢酸ソーダ、酢酸カリウム、クエン酸ソーダ、クエン酸カリウム、クエン酸—燐酸カリウム、トリスアセート、およびホウ酸—水酸化ソーダからなる。

34. 「特許請求の範囲3.3.」に記載の方法において、該バッファーの濃度は約2.0モル以下である。

35. 「特許請求の範囲2.7.」に記載の方法において、段階Bにおける該水性溶媒は更に有機溶媒を含む。

36. 「特許請求の範囲3.5.」に記載の方法において、該有機溶媒は水混和性である。

37. 「特許請求の範囲3.5.」に記載の方法において、該有機溶媒はエーテル、アルコール、エステル、ケトン、およびアミドからなる。

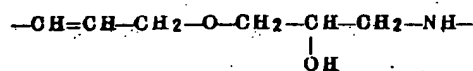
38. 「特許請求の範囲 3 7.」に記載の方法において、該有機溶媒はメタノール、エタノール、プロパノール、グリセリン、ジオキサン、アセトン、ピリジン、およびジメチルホルムアミドからなる。

39. 「特許請求の範囲 2 7.」に記載の方法において、A はビオチンまたはイノビオチン、そして M は N-ヒドロキシサクシミドエステル、イミデート、アンハイドライド、イソチオシアナート、およびエポキシドからなる。

40. 「特許請求の範囲 2 7.」に記載の方法において、M は N-ヒドロキシサクシミドエステルである。

41. 「特許請求の範囲 2 7.」に記載の方法において、M はイミデート、アンハイドライド、イソチオシアナート、およびエポキシドからなる。

46. 「特許請求の範囲 2 7.」に記載の方法において、該式・・・N によって表わされる該化学部分は

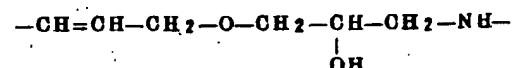


イミノビオチンである。

47. 構造式

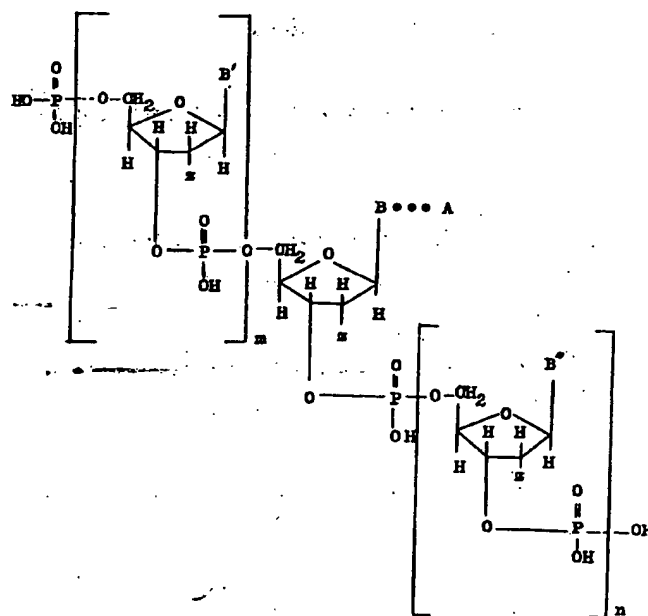
42. 「特許請求の範囲 2 7.」に記載の方法において、・・・N はチオール、カルボン酸、エポキシド、およびアミンからなる。

43. 「特許請求の範囲 2 7.」に記載の方法において、式・・・N で表わされる該化学部分は



ビオチンである。

45. 「特許請求の範囲 2 7.」に記載の方法において、該式・・・N によって表わされる該化学部分は $\text{—CH=CH—CH}_2\text{—NH—}$ イミノビオチンである。



ここに B、B'、および B'' の各々は糖部分の O' 位置に共有的に結合されたプリン、デアザプリン、またはピリミジン部分を表わし、B、B'、または B'' のいずれかがプリン

整数を表わす。

を有する化合物。

またはデアザプリンの時、該結合は該プリンまたはデアザプリンのN-位置に存し、B、B'、またはB''のいずれかがピリミジンの時、該結合はN'-位置に存するものと規定せられ、

Aは本化合物が対をなすリボ核酸またはデオキシリボ核酸分子によって形成される二重螺旋構造の中に取り入れられた時、ポリペプチドと共に検知され得る錯体を形成することの出来る少くとも3個の炭素原子からなる部分を表わし、

点線はBとAとからなる化学結合または組を表わし、もしBがプリンであれば該結合は該プリンの8-位置に存し、もしBが7-デアザプリンであれば該結合は該デアザプリンの7-位置に存し、そしてもしBがピリミジンであれば該結合はピリミジンの5-位置に存するものと規定せられ、

mはH-またはHO-を表わし、

そしてmとnは0から約100,000までの

またはアデニンである。

52. 「特許請求の範囲4.7.」に記載の化合物において、Aはリガンドである。

53. 「特許請求の範囲5.2.」に記載の化合物において、Aはハブテンである。

54. 「特許請求の範囲4.7.」に記載の化合物において、Aはピオチンである。

55. 「特許請求の範囲4.7.」に記載の化合物において、Aはイミノピオチンである。

56. 「特許請求の範囲4.7.」に記載の化合物において、点線で表わされる化学結合はBに関連してα-位置に存するオレフィン結合を含む。

57. 「特許請求の範囲4.7.」に記載の化合物に

48. 生物中に含まれる核酸のすべしもしくは唯一の部分と対になる「特許請求の範囲4.7.」に記載の化合物と、それと検出可能な錯体を形成し得るポリペプチドと、からなる例えばバクテリアのような生物が含んでいる核酸の存在を測定するために有用な診断用具。

49. 「特許請求の範囲4.7.」に記載の化合物において、mおよびnは同時に0でない。

50. 「特許請求の範囲4.7.」に記載の化合物において、Bはウラシル、シトシン、デアザアデニン、またはデアザグアニンである。

51. 「特許請求の範囲4.7.」に記載の化合物において、B'およびB''の各々は相互に異なりそしてウラシル、シトシン、チミン、グアニン、

において、化学結合は $-\text{CH}_2-\text{NH}-$ 部分を含む。

58. 「特許請求の範囲5.6.」に記載の化合物において、該オレフィン結合は $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{NH}-$ である。

59. 「特許請求の範囲5.6.」に記載の化合物において、該オレフィン結合は $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\underset{\text{OH}}{\text{CH}}-\text{CH}_2-\text{NH}-$ である。

60. 「特許請求の範囲5.6.」に記載の化合物において、該化学結合は $-\text{B}-\overset{\text{O}}{\underset{\text{||}}{\text{C}}}-\text{O}-$ 、およびO-からなる組から選ばれたかまたは該組から選ばれた部分を含む。

61. 「特許請求の範囲4.7.」に記載の化合物に

において、Aは少くとも5個の炭素原子を含む有機部分である。

62 「特許請求の範囲4.7.」に記載の化合物において、zはHO-である。

63 「特許請求の範囲4.7.」に記載の化合物において、zはH-である。

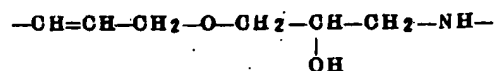
64 「特許請求の範囲6.2.」もしくは「特許請求の範囲6.3.」に記載の化合物において、Aはビオチンである。

65 「特許請求の範囲6.2.」または「特許請求の範囲6.3.」に記載の化合物において、Aはイミノビオチンである。

66 「特許請求の範囲6.2.、6.3.、6.4.、もしくは6.5.」のいずれにも記載の化合物において、該化学結合は $-CH=CH-CH_2-NH-$

である。

67 「特許請求の範囲6.2.、6.3.、6.4.、もしくは6.5.」のいずれにも記載の化合物において、該化学結合は



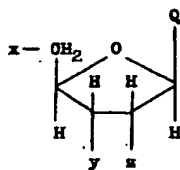
である。

68 「特許請求の範囲6.2.、6.3.、6.4.、6.5.、6.6.、もしくは6.7.」のいずれにも記載の化合物において、Bはウラシルである。

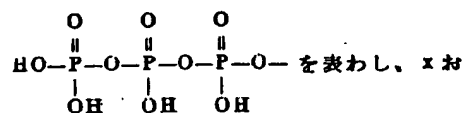
69 「特許請求の範囲4.7.」に記載の構造が複数個相互に結合した複合体からなる化合物。

70 「特許請求の範囲6.9.」に記載の化合物において、該複合体は2から約30までからなる。

71. 構造式



ここにQはB...A、B'、またはB''を表わし、そしてxおよびyのうちの一つは



をxおよびyのうちのその他のものはHO-を表わす。

を有するヌクレオチドトリホスフェイトを核酸鋳型の存在下適当な条件下において酵素的に重合せしめて本化合物を形成することからなる「特許請求の範囲4.7.」に記載の化合物を製造する方法。

72 「特許請求の範囲7.1.」に記載の方法にお

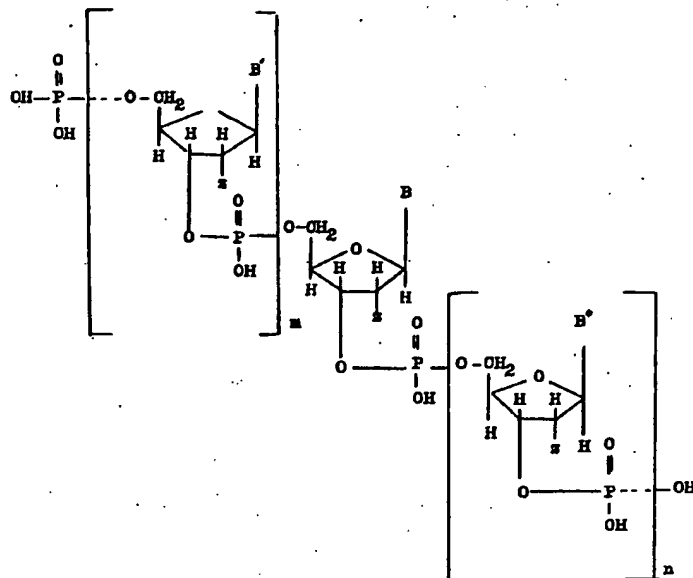
いて、上記酵素重合は該ヌクレオチドトリホスフェイトをE. coliのDNAポリメラーゼ、バクテリオファージT4 DNAポリメラーゼ、ネズミ科動物およびヒト(HeLa)細胞からのDNAポリメラーゼ、ヘルペス単純ウィルスからのDNAポリメラーゼ、E.

coliのRNAポリメラーゼ、バクテリオファージT7のRNAポリメラーゼ、HeLa細胞RNAポリメラーゼⅡ、子牛胸腺RNAポリメラーゼⅡ、およびハツカネズミ細胞RNAポリメラーゼⅡを含む真生核RNAポリメラーゼからなる群から選ばれた適当な酵素に接触せしめることからなる。

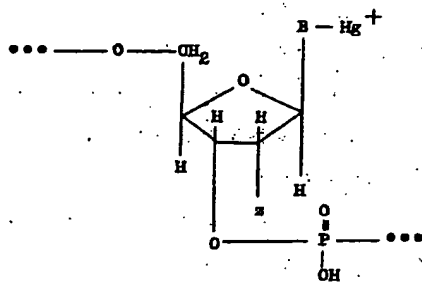
73 「特許請求の範囲2.0.」もしくは「特許請求の範囲2.1.」に記載の変性ヌクレオチドを適当な条件下にオリゴもしくはポリヌクレオチドの末端に付加せしめて本化合物を形成することからなる「特許請求の範囲4.7.」に記載の化合物の製造方法。

74. 「特許請求の範囲 73」に記載の方法において、該酵素の付加は該変性ヌクレオチドを RNA リガーゼと接触せしめることからなる。

75. (a) 構造式

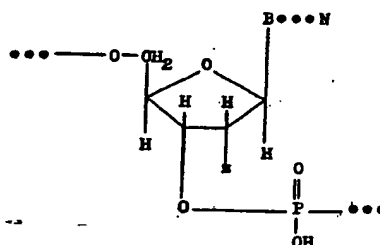


を有する化合物と、水銀塩とを適当な溶剤
中で適当な条件下で反応せしめて構造式



を有する水銀化誘導体を形成すること。

(b) 上記水銀化誘導体と、上記水銀化合物の —Hg^+ 部分と反応し得る式 $\cdots \text{N}$ によって表わされる化学部分と反応せしめ、上記反応は水性溶液中で K_2PdCl_4 の存在下適当な条件の下で行われ、構造式



・ここに~~N~~は反応性末端官能基またはAである。

を有する化合物を形成すること。

(e) 「特許請求の範囲 4.7.」の化合物を回収すること、 N が A の時または N が反応性末端基の時、上記化合物は構造式 $M-A$ 、ここに M は N と反応し得る官能基を表わすを有する化合物と水性溶液中、適当な条件下に反応せしめて「特許請求の範囲 4.7.」の上記化合物を形成せしめ、その後それを回収すること、

以上の段階からなる「特許請求の範囲 4 7.」

に記載の化合物の製造方法。

である。

76. 「特許請求の範囲75」に記載の方法において、該適当な条件は約1から14の範囲のpH、約5から100℃の範囲の温度、そして約3から24時間の範囲の反応時間からなる。

77. 「特許請求の範囲75」に記載の方法において、該水銀塩は酢酸水銀である。

78. 「特許請求の範囲75」に記載の方法において、式・・・Nで表わされる上記化学部分は $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ である。

79. 「特許請求の範囲75」に記載の方法において、式・・・Nで表わされる上記化学部分は

$$-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\underset{\text{OH}}{\text{CH}}-\text{CH}_2-\text{NH}_2$$

て、上記有機溶媒は水混和性である。

85. 「特許請求の範囲83」に記載の方法において、上記有機溶媒はエーテル、アルコール、エステル、ケトン、およびアミドからなる。

86. 「特許請求の範囲85」に記載の方法において、上記有機溶媒はメタノール、エタノール、プロパノール、グリセリン、ジオキサン、アセトン、ピリジン、およびジメチルホルムアミドからなる。

87. 「特許請求の範囲85」に記載の方法において、Aはビオチンまたはイミノビオチンからなり、そしてMはN-ヒドロキシサクシミドエステル、イミデート、アンハイドライド、イソチオシアナート、およびエポキシドからなる。

88. 「特許請求の範囲75」に記載の方法にお

80. 「特許請求の範囲75」に記載の方法において、上記水性溶媒はバッファーを含む。

81. 「特許請求の範囲80」に記載の方法において、上記バッファーは酢酸ソーダ、酢酸カリウム、クエン酸ソーダ、クエン酸カリウム、クエン酸-リン酸カリウム、トリス-酢酸、および硼酸-水酸化ソーダからなる。

82. 「特許請求の範囲81」に記載の方法において、上記バッファーの濃度は約2.0モル以下である。

83. 「特許請求の範囲75」に記載の方法において、段階(b)においては、該水性溶媒は更に有機溶媒を含む。

84. 「特許請求の範囲83」に記載の方法にお

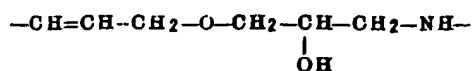
いて、MはN-ヒドロキシサクシミドエステルである。

89. 「特許請求の範囲75」に記載の方法において、Mはイミデート、アンハイドライド、イソチオシアナート、およびエポキシドからなる。

90. 「特許請求の範囲75」に記載の方法において、・・・Nはチオール、カルボン酸、エポキシド、およびアミンからなる。

91. 「特許請求の範囲75」に記載される方法において、式・・・Nで表わされる該化学部分は $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{NH}-$ ビオチンである。

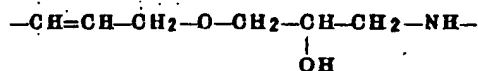
92. 「特許請求の範囲75」に記載される方法において、該式・・・Nによって表わされる該化学部分は



ビオチンである。

93. 「特許請求の範囲 7 5」に記載される方法において、該式・・・Nによって表わされる該化学部分は—CH=CH—CH₂—NH—イミノビオチンである。

94. 「特許請求の範囲 7 5」に記載される方法において、該式・・・Nによって表わされる該化学部分は



イミノビオチンである。

95. 本化合物を適当な条件下でこれと錯体を形成し得るポリペプチドと接触せしめて上記錯体を形成すること、該ポリペプチドは本化合物と該ポリペプチドとの該錯体が形成される

100. 「特許請求の範囲 9 5」に記載の方法において、該ポリペプチド中に含まれる検出され得る部分は蛍光染料、高電子密度試薬、または不溶性反応生成物を沈積し得る酵素である。

101. 「特許請求の範囲 1」に記載の化合物と、本化合物と錯体を形成し得るポリペプチドからなる錯化合物。

102. 「特許請求の範囲 101」に記載の錯化合物において、該ポリペプチドは検出され得る部分を含む。

103. 「特許請求の範囲 102」に記載の錯化合物において、該検出され得る部分は蛍光染料、高電子密度試薬、または不溶性反応生成物を沈積し得る酵素である。

104. 本化合物を適当な条件下でこれと錯体を形成し得るポリペプチドと接触せしめて上記錯

時、検出されることが出来る部分を含み得る、そして適当な検出手法を用いて該錯体を検出すること、からなる「特許請求の範囲 1」に記載の化合物の検出方法。

96. 「特許請求の範囲 9 5」に記載の方法において、上記化合物の部分 A はビオチンおよびイミノビオチンからなる。

97. 「特許請求の範囲 9 5」に記載の方法において、上記ポリペプチドはアヴィジン、ストレプトアヴィジン、および Ig G アンチ—A—イムノグロブリンからなる。

98. 「特許請求の範囲 9 5」に記載の方法において、上記化合物の部分 A はハプテンであり、そして上記ポリペプチドは抗体である。

99. 「特許請求の範囲 9 5」に記載の方法において、上記化合物の部分 A はリガンドである。

体を形成すること、該ポリペプチドは本化合物と該ポリペプチドとの該錯体が形成される時、検出されることが出来る部分を含む、そして適当な検出手法を用いて該錯体を検出すること、からなる「特許請求の範囲 4 7」に記載の化合物の検出方法。

105. 「特許請求の範囲 104」に記載の方法において、上記化合物の部分 A はビオチンおよびイミノビオチンからなる。

106. 「特許請求の範囲 104」に記載の方法において、上記ポリペプチドはアヴィジン、ストレプトアヴィジン、および Ig G アンチ—A—イムノグロブリンからなる。

107. 「特許請求の範囲 104」に記載の方法において、上記化合物の部分 A はハプテンであり、そして上記ポリペプチドはそれに対する抗体である。

108. 「特許請求の範囲104.」に記載の方法において、上記化合物の部分Aはリガンドである。
109. 「特許請求の範囲104.」に記載の方法において、該ポリペプチド中に含まれる検出され得る部分は蛍光染料、高電子密度試薬、または不溶性反応生成物を沈積し得る酵素である。
110. 「特許請求の範囲47.」に記載の化合物と、本化合物と錯体を形成し得るポリペプチドからなる錯化合物。
111. 「特許請求の範囲110.」に記載の錯化合物において、該ポリペプチドは検出され得る部分を含む。
112. 「特許請求の範囲111.」に記載の錯化合物において、該検出され得る部分は蛍光染料、高電子密度試薬、または不溶性反応生成物を沈積し得る酵素である。
116. 「特許請求の範囲113.」に記載の方法において、上記化合物の部分Aはハプテンであり、そして上記ポリペプチドはそれに対する抗体である。
117. 「特許請求の範囲113.」に記載の方法において、上記化合物の部分Aはリガンドである。
118. 「特許請求の範囲113.」に記載の方法において、該ポリペプチド中に含まれる検出され得る部分は蛍光染料、高電子密度試薬、または不溶性反応生成物を沈積し得る酵素である。
119. 「特許請求の範囲1.」または「特許請求の範囲47.」のいずれにも記載の化合物を含む二重螺旋構造ポリヌクレオチド複合体。
120. 「特許請求の範囲119.」に記載の複合体において、該ポリヌクレオチド螺旋構造はリボ核酸分子である。
113. 該ポリヌクレオチド複合体をこれと錯体を形成し得るポリペプチドと適当な条件下において接触せしめて該錯体を形成すること、該ポリペプチドは該ポリヌクレオチド複合体と該ポリペプチドとの錯体が形成される時、検出され得る部分を含む、および該錯体を検出すること、からなる「特許請求の範囲1.」または「特許請求の範囲47.」のいずれにも記載の化合物を含む二重螺旋構造ポリヌクレオチド複合体の検出方法。
114. 「特許請求の範囲113.」に記載の方法において、上記ポリヌクレオチド複合体の部分Aはビオチンおよびイミノビオチンからなる。
115. 「特許請求の範囲113.」に記載の方法において、上記ポリペプチドはアヴィデン、ストレプトアヴィデン、およびIgGアンチーアイムノグロブリンからなる。
121. 「特許請求の範囲119.」に記載の複合体において、該ポリヌクレオチド螺旋構造はデオキシリボ核酸分子である。
122. 「特許請求の範囲119.」に記載の複合体と該複合体と錯体を形成し得るポリペプチドとからなる分子錯体。
123. 「特許請求の範囲122.」に記載の分子錯体において、上記ポリペプチドは検出され得る部分を含む。
124. 「特許請求の範囲123.」に記載の分子錯体において、該検出され得る部分は蛍光染料、高電子密度試薬、または不溶性反応生成物を沈積し得る酵素である。
125. デオキシリボ核酸またはリボ核酸分子と「特許請求の範囲47.」に記載の化合物とに相当するかもしくはそれから誘導されるデオ

キシリボ核酸またはリボ核酸の単一螺旋構造を含む二重螺旋構造の交配ポリヌクレオチド複合体を形成すること、および「特許請求の範囲 113」の方法によって該二重螺旋構造の交配ポリヌクレオチドを検出すること、からなるデオキシリボ核酸もしくはリボ核酸分子の存在を測定する方法。

126. 「特許請求の範囲 125」に記載の方法において、該デオキシリボ核酸またはリボ核酸は生きている生物から誘導される。

127. 「特許請求の範囲 125」に記載の方法において、該生きている生物はバクテリア、菌、ウィルス、イーストおよび哺乳動物からなる。

128. 被検物から適当な試料を得ること、病因に当然に関連するデオキシリボ核酸もしくはリボ核酸の該試料中における存在を「特許請求の範囲 47」に記載の化合物と、適当な条件

製すること、該ポリヌクレオチドを適当な条件下において該バクテリアから得られたデオキシリボ核酸と接触せしめて二重螺旋構造の交配複合体を形成すること、該複合体を該交配複合体と適当な条件下で錯体を形成し得るポリペプチドと接触せしめること、該ポリペプチドはもし該錯体が形成されるならば検出されることが出来る部分を含む、および適当な検出手法を用いて該錯体の存在を検出すること、該錯体の存在は該抗生物質に対する耐性を発現し、該錯体の不存在は該抗生物質に対する感受性を発現する、以上からなる抗生物質に対する耐性の存在を測定するためのバクテリア試験方法。

131. 「特許請求の範囲 130」に記載の方法において、上記バクテリアはストレプトコッカス、ピオゲネス、もしくはネイセリヤ メニンギテジス、そして上記抗生物質はペニシリンである。

下において該病因と当然に関連する該デオキシリボ核酸もしくはリボ核酸に相当するかもしくはそれから誘導されるデオキシリボ核酸もしくはリボ核酸の単一螺旋構造とを含む二重螺旋構造のポリヌクレオチド複合体を形成することによって測定すること、および「特許請求の範囲 113」の方法を用いて該二重螺旋構造のポリヌクレオチド複合体の存在を検出すること、からなる被検物中の核酸を含む病因の存在を診断する方法。

129. 「特許請求の範囲 128」に記載の方法において、該被検物はヒト、または動物であり、そして該病因はバクテリア、ウィルス、および菌を含む。

130. 抗生物質に対して耐性を与え、そしてその中に取入れられる「特許請求の範囲 1」の化合物を含むバクテリアのデオキシリボ核酸遺伝子列と対をなすべきポリヌクレオチドを調

132. 「特許請求の範囲 130」に記載の方法において、上記バクテリアはスタフィロコッカス アウレウス、カンディダ アルビカンズ、ブシュードモナス アエルギノザ、ストレプトコッカス ピオゲネス、もしくはネイセリヤ ユロエアエ、そして上記抗生物質はテトラサイクリンである。

133. 「特許請求の範囲 130」に記載の方法において、上記バクテリアはミコバクテリウム テューベルクシス、そして上記抗生物質はアミノグリコシドである。

134. 遺伝的不調に関連しそしてその中に取入れられる「特許請求の範囲 1」の化合物を含む被検体のデオキシリボ核酸遺伝子列と対をなすべきポリヌクレオチドを調製すること、該ヌクレオチドを適当な条件下で被検体から得られたデオキシリボ核酸と接触せしめて二重螺旋構造交配 合体を形成すること、該複合

体を該交配複合体と錯体を形成し得るポリペプチドと接触せしめること、該ポリペプチドは該錯体が形成される時、検出されることが出来る部分を含む、および適当な検出手法を用いて該錯体の存在を検出すること、該錯体の存在または不存在は該遺伝的不調の存在または不存在となって発現される、以上からなる被検体中の遺伝的不調の診断方法。

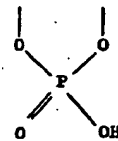
135. β -マイナスマラセミア被検体においては存在せずしてその中に取入れられる「特許請求の範囲 1.」の化合物を含むデオキシリボ核酸遺伝子列と対をなすべきポリヌクレオチドを調製すること、該ポリヌクレオチドを適当な条件下において該被検体から得られたデオキシリボ核酸と接触せしめて二重螺旋構造交配複合体を形成すること、該複合体を該交配複合体と適当な条件下において錯体を形成し得るポリペプチドと接触せしめること、該ポリペプチドは該錯体が形成される時検出さ

137. 少くとも一つのウラシル部分が変性ウラシル部分が二重螺旋構造のポリA-ポリU複合体の中へ取入れられる時ポリペプチドと共に検出し得る錯体を形成することの出来る少くとも三つの炭素原子からなる部分Aの5-位置に化学的付加されている変性ポリU分子を調製すること、かようなポリA-ポリU複合体を、該ポリA連鎖を含んでいる該ポリヌクレオチドと該変性ポリU分子とを適当な条件下において接触せしめることによって形成すること、および結果として得られた複合体を検出してそれによって該ポリヌクレオチドを検出すること、からなる末端ポリヌクレオチド連鎖ポリAを含むポリヌクレオチドの検出方法。

138. 「特許請求の範囲 1.」に記載の化合物において、xはH-またはHO-そしてxおよびyは反応せしめられて環状部分

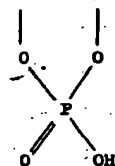
れることが出来る部分を含んでいる、そして適当な検出手法を用いて該錯体の存在を検出すること、該錯体の不存在は β -マイナスマラセミアの存在を発現する、以上からなるヒト被検体におけるマラセミアの検診方法。

136. 染色体上に配置される限定された一連の遺伝連鎖に相当する一連の変性ポリヌクレオチドを調製すること、該ポリヌクレオチドは「特許請求の範囲 1.」に記載の化合物を含む、該ポリヌクレオチドを染色体から得られたデオキシリボ核酸と接触せしめて交配複合体を形成すること、該複合体の各々を該複合体の各々と錯体を形成し得るポリペプチドと接触せしめること、該ポリペプチドは該錯体が形成される時検出されることが出来る部分を含む、そして該染色体上の各々の錯体の位置を測定してそれによって該染色体上の遺伝連鎖の位置を測定すること、からなる染色体の核型決定方法。



を形成する。

139. 「特許請求の範囲 1.」に記載の化合物において、xはH-またはHO-そしてyおよびzは反応せしめられて環状部分



を形成する。

140. 「特許請求の範囲 138 または 139.」に記載の化合物を結合せしめるに適当な条件下にお

いて細胞の表面のホルモン接受位置と結合せしめること、該細胞を分裂せしめて該化合物が結合されている細胞表面断片を形成すること、該細胞表面断片を別々に回収すること、そしてそれらを識別して該ホルモン接受位置を識別すること、からなる細胞の表面のホルモン接受位置を識別する方法。

141. 「特許請求の範囲140.」の方法によって悪性細胞に関連されている異常ホルモン接受位置を検出することによって悪性細胞を検出することからなる腫瘍もしくは病識別の方法。

142. 腫瘍細胞の診断に役立つポリペプチドの生成に関連するデオキシリボ核酸遺伝子連鎖から合成されるメッセンジャーリボ核酸と対をなしそして「特許請求の範囲1.」に記載の化合物を含むポリヌクレオチドを調製すること、該ポリヌクレオチドを適当な条件下において該細胞の中へ導入して該ポリヌクレオチドを

の検出、監視、位置決め、分離等を行うことを可能にする有用な指針検査を提供する。今日まで、放射性物質はもっとも敏感な、そして多くの場合多くの重要な実験もしくは分析試験を遂行するための唯一の手段を提供して来た。しかしながら放射性化合物の使用に関連して重大なる制限と障害がある。第一に、放射性物質を取扱かう作業者は放射能の危険な水準に曝されるおそれがあり得るから手の込んだ安全な予防策が放射性同位元素の調製、利用、そして廃棄処分間に維持されていなければならない。第二に放射性ヌクレオチドには主として適当な保護手段、生産者—使用者健康監視サービス、そして廃棄処分計画を提供するに必要な装置や人力の費用によるものであるが購入や使用のために莫大な費用がかかる。第三に放射性物質は屢々非常に不安定であり限られた保存期間を有し、そしてそのために更に使用費用が増大する。この不安定性は放射性同位元素それ自身の崩壊に関連する破効果による放射線の分解、そして多

量デオキシリボ核酸遺伝子連鎖と交配せしめること、そして該ポリヌクレオチドが交配したかどうかを測定すること、からなる腫瘍細胞の診断方法。

143. 「特許請求の範囲142.」に記載の方法において、該ポリペプチドはα-胎児蛋白質である。

144. 「特許請求の範囲142.」に記載の方法において、該ポリペプチドは癌胚抗原である。

3 発明の詳細な説明

生物医学研究において用いられる多くの手順とDNA再結合手法は水素(3H)、磷(32P)、炭素(14C)、もしくはヨウ素(125I)の同位元素によって放射能標識されたヌクレオチドもしくはポリヌクレオチド誘導体の使用に大巾にたよっている。このような放射性化合物は単に甚だしく少量の存在であっても使用者が核酸

の放射性同位元素(例えば32Pおよび125I)はたった数日の半減期しか有しないと言う事実に悩因するものである。

ハプタンは抗体と結合し得るが担体と結合した場合においてのみ免疫性応答を行い得ると言うことは知られている。この性質は検出および識別試験に利用されることが出来る。

またビオチンやイミノビオチンはアビチン、卵白からの66,000ダルトングリコプロテインと強力に相互作用を行うことも知られている。この相互作用は自然にみられる最も堅固な非共有結合常数($K_{dis}=10^{15}$)の一つを示す。もしアビチンが例えばフルオレセインまたはローダミンのような蛍光染料、例えばフェリチン、ヘモシアニンもしくはコロイダル金のような高電子密度試薬、もしくは例えばパーオキシダーゼもしくはアルカリホスファターゼのような不溶解性反応生成物を沈積し得る酵素を含む顕示し得る能力のある指標分子と結びつけられる

ならばビオチン探査子の存在、位置、もしくは量は証明せられることが出来るであろう。イミノビオチンはビオチンよりも若干弱くアビデンと結合するけれども、同様な反応がその検出のために用いられ得る。更に、溶液のpHを減少させることによってイミノビオチン-アビデン相互作用が転換され得ることはある応用において顕著な利点を提供する。

ビオチン-アビデン錯体の特性と保持力は近年細胞上もしくは細胞の中の特定の蛋白質、リビド、もしくは炭水化物を可視的に位置決めするための方法を開発するために用いられて来ている (E. A. Bayer と M. Wilshok *Method of Biochemical Analysis*, 26, 1, 1980 において検討される)。RNAの染色体位置はビオチン化した蛋白質、化学的にRNAと架橋されたチトクロームC、を交配探査子として用いて電子顕微鏡によって測定されている。交配の場所はアビデン-ビオチン相互作用によって

更にピリミデンやプリン環に化学部分を付加する方法が知られている。数年前に簡単なそして迅速なアセトキシ水銀化反応が水銀原子の共有結合をヌクレオチドおよびポリヌクレオチドの両方におけるピリミデン環の5-位置、プリン環のC-8位置もしくは7-デアザプリン環のC-7位置の中に導入するために開発された。(B. M. K. Dale, D. G. Livingston および D. C. Ward, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 70, 2238, 1973; B. M. K. Dale, E. Martin, D. G. Livingston および D. C. Ward, *Biochemistry*, 14, 2447, 1975.)

有機水銀化合物がパラジウム触媒の存在下においてオレフィン化合物と反応して炭素-炭素結合を形成することは数年前に知られていた。(B. F. Heck, *J. Am. Chem. Soc.*, 90, 5518, 1968; B. F. Heck, *Ibid.*, 90, 5526, 1968; B. F. Heck, *Ibid.*, 90, 5531, 1968; B. F. Heck, *Ibid.*, 90,

仲介されるアビデン-フェリチンもしくはアビデン-メタクリレート領域の結合を介して可視化された (J. E. Manning, N. D. Hershey, T. R. Broker, M. Pellegrini, H. K. Mitchell, および N. Davidson, *Chromosoma*, 53, 107, 1975; J. E. Manning, M. Pellegrini, および N. Davidson, *Biochemistry*, 61, 1364, 1977; T. R. Broker, L. M. Angerer, P. H. Yen, N. D. Hershey, および N. Davidson, *Nucleic Acid Res.*, 5, 363, 1978; A. Sodja および N. Davidson, *Nucleic Acid Res.*, 5, 383, 1978.)

ポリヌクレオチド連鎖の検出に対するこのアプローチは高度に反復された連鎖のような特殊化せられた場合においては試験が成功したけれども単一もしくは低い複写数において存在するポリヌクレオチドの分析に対しては一般的に有用ではない。

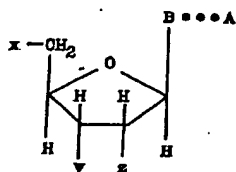
5535, 1968; および B. F. Heck, *J. Am. Chem. Soc.* 91, 6707, 1969.) Bergstrom と共同研究者 (J. L. Bath および D. E. Bergstrom, *J. Org. Chem.*, 43, 2870, 1978; および D. E. Bergstrom および M. K. Ogawa, *J. Am. Chem. Soc.*, 100, 8106, 1978.) および Biggo, 等 (C. F. Biggo, P. Kalaritis, J. B. Deck および M. P. Martos, *J. Am. Chem. Soc.*, 102, 2033, 1980.) は最近この反応をC-5置換ピリミデンヌクレオチド化合物の合成に応用しようと企てた。

最後にヌクレオチドを変性するために特定の抗体が調整されることが出来、そして該変性ヌクレオチドの特定の構成を単離しそして特徴づけるために用いられることが出来ることは知られている (T. W. Munns および M. K. Liszewski, *Progress in Nucleic Acid Research* および *Molecular Biology*, 24, 109, 1980.)。しかしながら、今日までに自

然に生ずるヌクレオチドに対して調製される抗体のいかなるものもそれが二重螺旋構造のRNAもしくはDNA複合体中に存在する時、もしくはDNA-RNA交配分子中に存在する時、これらヌクレオチド測定子との反応を示さなかった。

放射能的に標識付けされた探査子もしくは今迄に利用された化学および生物学的探査子の限界を回避するためにピリミジンもしくはプリン環と共有的に結合しているピオチン、イミノピオチン、リボ酸、そして他の測定子が合成されている。これらヌクレオチド誘導体はそれらを含んでいるポリヌクレオチドや補酵素と同様にアピチンもしくは抗体のような蛋白質と選択的にそして特異に相互作用を行うであろう。変性ヌクレオチドと特定の蛋白質との間の相互作用は最近生物医学的にそしてDNA再結合手法において用いられている多くの手順において核酸成分の検出および配置のための放射性同位元素に代るものとして利用されることが出来る。と

本発明によれば構造式



ここにBは糖部分の O^5 位置に共有的に結合されたプリン、 γ -デアザプリンまたはピリミジン部分を表わし、Bがプリンまたは γ -デアザプリンの時、該結合は該プリンまたはデアザプリンの N^9 位置に存し、Bがピリミジンの時、該結合は N^1 位置に存するものと規定せられ、

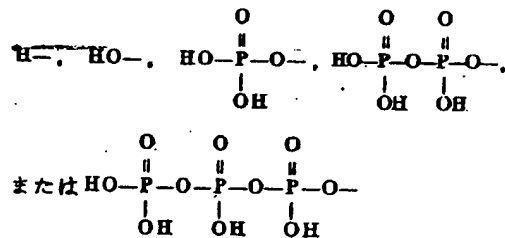
A は本化合物が二重螺旋構造のリボ核酸，デオキシリボ核酸複合体、または DNA-BNA 交配物中に取入れられた時、ポリペプチドと共に検知され得る錯体を形成することの出来る少なくとも 3 個の炭素原子からなる部分を表わし、

点線は B と A とからなる結合または組を表わ

れら変性ヌクレオチド—蛋白質相互作用を用いる方法は放射性同位元素を利用する手順に等しいかそれよりも大きな検出能力を有し、そしてそれらは屢々より迅速にそしてより大きな分解能によって遂行されることが出来る。

これら新しいヌクレオチド誘導体は以下により完全に検討されるように開発せられそして画一化せられて来た化学的手順によって比較的安価に調製せられることが出来る。更に意義深いことには本発明のヌクレオチド探査子もそれらに用いられる蛋白質試薬も放射性ではないから該化合物は放射性同位元素の取扱かい上要求される手の込んだ安全手順なくして調製せられ、利用せられ、そして処理される。更にこれらヌクレオチド誘導体は化学的に安定であって数年もしくはそれ以上の可使保存期間を有することが期待されることが出来る。最後にこれら化合物はより安全な、より経済的な、より迅速な、そしてより再現性のある研究および診断手順の開発を可能ならしめる。

し、もしBがプリンであれば該結合は該プリンの8-位置に存し、もしBが7-デアザプリンであれば該結合は該デアザプリンの7-位置に存し、そしてもしBがピリミジンであれば該結合は該ピリミジンの5-位置に存するものと規定せられ、そしてx、yおよびzの各々は



を喪わす。一

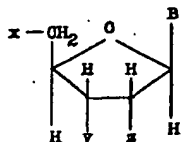
を有する化合物が提供せられ、該化合物は生物医学研究およびDNA再結合手法における探査子として広く有用である。

この構造の範囲に包含される化合物のうち特に有用なものは更に次に示す特性の一つもしくは

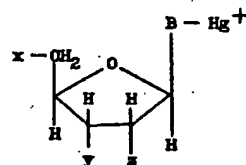
はそれ以上を有する：Aは非芳香性である；Aは少くともC5である；BとAとからなる化学結合は一つの α -オレフィン結合を含む；Aはピオチンもしくはイミノピオチンである；そしてBはピリミデンもしくは7-デアザプリンである。

これら化合物は

(a) 構造式

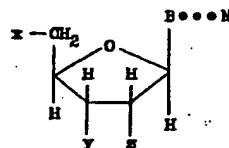


を有する化合物と水銀塩とを適当な溶媒中で適当な条件下において反応せしめて構造式



を有する水銀化合物を形成すること。

(b) 上記水銀化合物を該水銀化合物の-Hg⁺部分と反応し得、そして式・・・Nによって表わされる化学部分と反応せしめること、上記反応は水性溶媒中で、そしてK₂PdCl₄の存在下に、適当な条件下において行われ、構造式



ここにNは反応性末端官能基もしくはAである。

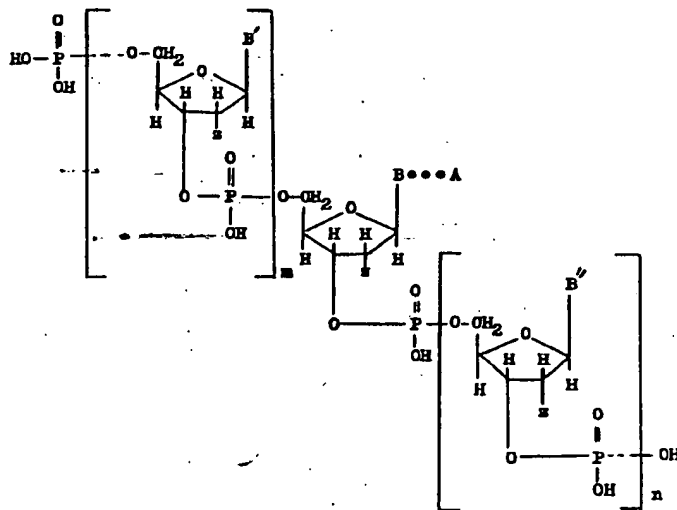
を有する化合物を形成する。

そして

(c) 該化合物を上記変性ヌクレオチドとして回収すること、NがAの時またはNが反応性末端基の時、該化合物は構造式M-Aを有する化合物、ここにMはNと反応可能な官能基を表わす、と水性溶媒中適当な条件下において反応せしめられて上記変性ヌクレオチドを生成し、それから該変性ヌクレオチドが回収せられる。

以上の段階を含む工程によって調整せられるであろう。

本発明はまた構造式



ここにB、B'、およびB''の各々は糖部分のO¹-位置に共有的に結合されたプリン、デアザプリン、またはピリミジン部分を表わし、B、B'、またはB''のいずれかがプリンまたは

を有する化合物を提供するものである。

これら化合物は本発明の変性ヌクレオチドを含むヌクレオチドの混合物の酵素的重合によって調製されることが出来る。それに代えてオリゴーもしくはポリヌクレオチド中に存在するヌクレオチドは化学的方法を用いて変性されるであろう。

本発明の実施によって変性されるヌクレオチドそしてその中に該変性ヌクレオチドが取り入れられているオリゴーおよびポリヌクレオチドは生物医学研究、臨床診断、そしてDNA再結合手法における探査子として用いられるであろう。これらの種々の有用性はポリペプチドの中に本来的に存在する性質によるか、あるいはポリペプチドに結合されるかもしくはそれと相互作用を行う検出可能な部分によって順番に検出されることの出来る安定な錯体をポリペプチドと共に形成する該分子の能力に基づくものである。

デアザプリンの時、該結合は該プリンまたはデアザプリンのN⁹-位置に存し、B、B'、またはB''のいずれかがピリミジンの時、該結合はN¹-位置に存するものと規定せられ、

Aは本化合物が対をなすリボ核酸またはデオキシリボ核酸分子によって形成される二重螺旋構造の中に取り入れられた時、ポリペプチドと共に検出され得る錯体を形成することの出来る少くとも3個の炭素原子からなる部分を表わし、

点線はBとAとからなる化学結合または組を表わし、もしBがプリンであれば該結合は該プリンの8-位置に存し、もしBが7-デアザプリンであれば該結合は該デアザプリンの7-位置に存し、そしてもしBがピリミジンであれば該結合はピリミジンの5-位置に存するものと規定せられ、

xはH-またはH₂O-を表わし、

そしてmとnは0から約100,000までの整数を表わす。

いくつかの用途は例えばバクテリアやウィルスのような核酸を含む病因の検出と識別、抗生物質耐性に対するバクテリアのスクリーニング、例えばサラセミアや鎌状細胞貧血症のような遺伝的不調の診断、染色体核型分類、そして腫瘍細胞の識別を含む。

本発明を以下に詳細に説明する。

自然に発生したヌクレオチドの放射性標識付けされた形状に置き代わるものとして変性ヌクレオチドが一般的に適するためにはいくつかの本質的な規準が満足されなければならない。第一に、該変性化合物は独特な、即ちヌクレオチドもしくはポリヌクレオチドに関連して正常には見出されない置換基もしくは探査子を含んでいなければならない。第二に、該探査子は化学的もしくは生物学的試薬と特別に反応して鋭敏な検出システムを提供しなければならない。第三に、多くの実際の応用が、該相似物が酵素的に代謝され、例えば該相似性が核酸ポリメラー

ゼに対する基質としての役目をすべきことを要求しているので該相似物は一般的に研究されている核酸酵素に対する比較的効果的な基質でなければならない。この目的のために、探査子部分は立体的位置に関して、あるいは逆に、

塩基の正常なワトソン-クリック水素結合能力を妨害する環位置に配置されてはならない。さもなければ該置換体はポリメラーゼ基質として不活性な化合物を得るであろう。形状変化は通常ヌクレオチド誘導体をポリメラーゼ基質として受容することが出来ないようにするので正常な“アンチ”ヌクレオチド形状を変更するような環位置の置換はまた避けられなければならない。

第四に、該検出システムは核酸交配方法と矛盾しないために一重螺旋構造および二重螺旋構造の両方のポリヌクレオチドの中に取り入れられる探査子置換体と相互作用を行う能力を有すべきである。この基準を満足せしめるには、そ

れが抗体、その他の検出蛋白質、もしくは化学試薬と容易に相互作用を行うことが出来るように化学結合もしくは「結合手」を介して該探索子部分がプリンもしくはピリミジンと結合されていることが望ましい。

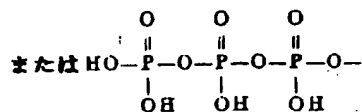
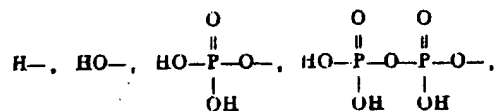
第五に、探索子置換体の少数を含んでいるポリヌクレオチドの物理的および生化学的性質は放射性交配探索子を用いる最近の手順が広範囲にわたって変性される必要がないがために大巾に変更されるべきではない。この規率は該探索子が酵素的に導入されるかまたは直接化学的手段で導入されるかのいずれの場合においても満足せしめられねばならない。

最後に、該探索子が付加される結合は正常なヌクレオチドおよびポリヌクレオチドが日常支配されているすべての実験的条件、例えば高温における長期の交配時間、フェノールおよび有機溶剤抽出、電気泳動等に耐えるべきである。

来る少くとも3個の炭素原子からなる部分を表わし、

点線はBとAとからなる結合または組を表わし、もしBがプリンであれば該結合は該プリンの8-位置に存し、もしBが7-デアザプリンであれば該結合は該デアザプリンの7-位置に存し、そしてもしBがピリミジンであれば該結合は該ピリミジンの5-位置に存するものと規定せられ、

そしてx, y および z の各々は



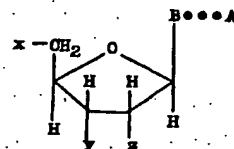
を表わす。

を有する化合物である。

これら化合物は生物医学研究およびDNA再

これら規則のすべてはここに記述される変性ヌクレオチドによって満足せしめられる。

該変性ヌクレオチドとは構造式



ここにBは糖部分のC^{1'}位置に共有的に結合されたプリン、7-デアザプリンまたはピリミジン部分を表わし、Bがプリンまたは7-デアザプリンの時、該結合は該プリンまたはデアザプリンのN⁹-位置に存し、Bがピリミジンの時、該結合はN¹-位置に存するものと規定せられ、

Aは本化合物が二重螺旋構造のポリ核酸、デオキシリボ核酸複合体、またはDNA-BNA交配物中に取り入れられた時、ポリペプチドと共に検知され得る錯体を形成することの出

結合手法における探索子として広く有用である。

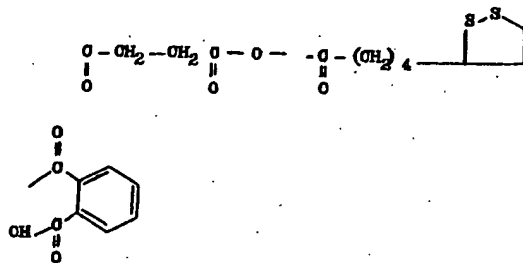
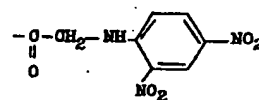
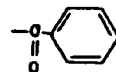
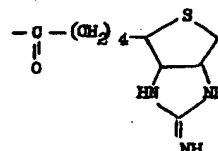
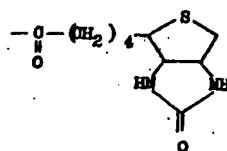
この構造式の範囲に包含されるすべての化合物は主として本発明の実施によって調製されそして使用されるであろうけれども、該化合物のいくらかのものより容易に調製されもしくは/そして使用され、そしてそれ故に目下の所より望ましいものである。

かくしてプリン、ピリミジン、および7-デアザプリンは主として有用なものであるけれども、ピリミジン、および7-デアザプリンはプリン8-位置置換体が該核酸をポリメラーゼ基質として無効にするから望ましいものである。かくして変性プリンはある点では有用であるけれどもピリミジンおよび7-デアザプリン程一般的に有用ではない。更に本発明に有用なピリミジンおよび7-デアザプリンは夫々5-もしくは7-位置に当然置換されてはならない。結果として、チミン、5-メチルシトシン、およ

び5-ハイドロキシメチルシトシンのようないくらかの塩基は有用でない。目下の所有用な塩基はシトシン、ウラシル、デアザアデニン、およびデアザグアニンである。

Aは少なくとも三個の炭素原子を有し、そして変性ヌクレオチドがデオキシリボ核酸カリボ核酸かのいずれかに取入れられた時ポリヌクレオチドと検出可能な錯体を形成し得るいかなる部分にも相当する。

Aはそれ故に適当な錯体に付加した時単に免疫原的であるが、しかし適当な抗体と相互作用を行って錯体を形成し得るハプテンを含むこれら性質を有しているいかなるリガンドにも相当するであろう。有用であるこれら部分の例は次の通りである。



これら望ましいA部分としてはビオチン、およびイミノビオチンがある。

更に芳香性部分は塩基と対になっている螺旋

構造の中に介入せんとする傾向があるので、部分Aは非芳香性であることが望ましい。またより小さい部分はポリペプチドとの分子相互作用が充分でないから、充分な相互作用が起って安定な錯体を形成せしめるためにはAは少なくともC5であることが望ましい。ビチンとイミノビオチンはこれら基準の両方を満足する。しかしながら、化学結合はBに関連してα-位置にオレフィン結合を含むことが一般的に望ましい。このようなα-オレフィン結合の存在は塩基がよく知られている二重螺旋形状において他のものと対をなす時、部分Aが該塩基から離れた所に維持する役目を果たす。これはポリペプチドとの相互作用をより容易に行わしめ、それによって錯体の形成を促進せしめる。更に大きな回転自由度を有する一重結合は必ずしも螺旋から該部分を充分離れた所に維持してポリペプチドによる認識およびポリペプチドとの錯体の形成を行わしめるわけではない。

化学結合の鎖が第一級アミンから誘導され、そして $-\text{CH}_2-\text{NH}-$ 構造を有することは、このような化学結合がよく知られたアミン変性反応のいかなるものも利用して容易に形成されるからさらにより望ましいことである。アリルアミンおよびアリル-(3-アミノ-2-ハイドロキシ-1-プロピル)エーテル基から誘導される望ましい化学結合の例は夫々式

$$-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{NH}-$$
および

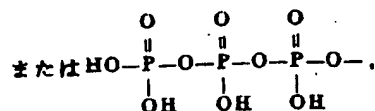
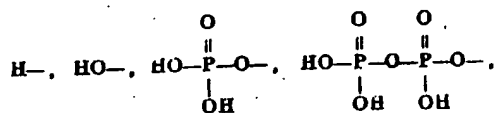
$$-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\underset{\text{OH}}{\text{CH}}-\text{CH}_2-\text{NH}-$$
を有する。

これらの結合は望ましいものではあるけれども、特に例えばチオール、カルボン酸、およびエポキシド官能基のような他の変性可能な官能基を有するオレフィン結合手を含むその他のものも使用されることが出来る。

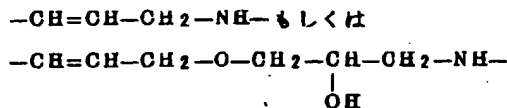
該結合鎖は 別な位置、即ちピリミチンの5

一位置、プリン⁸位置、もしくはデアザプリンの7位置に結合する。前に述べたように、プリン⁸位置の置換はここに検討されるすべての方法において有用な変性ヌクレオチドを形成しない。プリン⁷位置は窒素原子で占められているが、結合鎖が結びつく点になり得るであろう。しかしながら今日用いられそしてここに検討される化学的置換方法はこの目的には適していない。

記号x, y, およびzは糖部分5', 3', および2'位置に結びついている基を表わす。これらは



のうちのいずれかである。



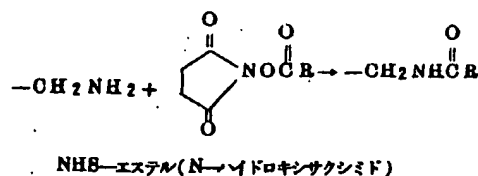
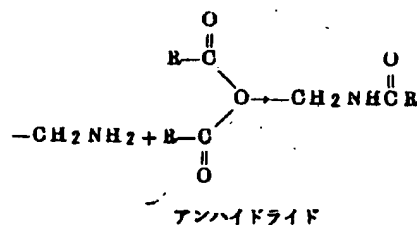
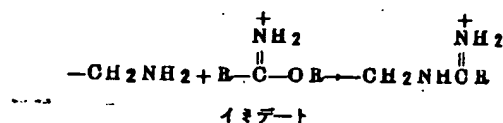
そしてBがウラシルもしくはシトシンであるこのタイプの変性ヌクレオチドを含む。

結合鎖手および探索子部分を塩基上へ導入するために採用せられる一般的な合成方法は上記に検討せられる(J. L. RuthおよびD. E. Bergstrom, J. Org. Chem., 43, 2870, 1978; D. E. BergstromおよびM. K. Ogawa, J. Amer. Chem. Soc. 100, 8106, 1978; およびC. F. Bigge, P. Kalaritis, J. R. Deck およびM. P. Mertes, J. Amer. Chem. Soc. 102, 2033, 1980. をみよ)

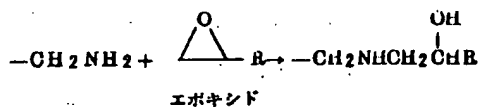
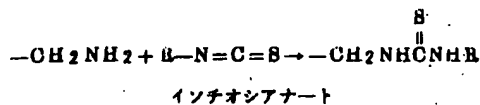
しかしながら、ここに用いられるオレフィン置換体は以前には用いられたことがない。探索子部分Aの結びつきを容易にするために、例えばアリルアミン[AA]、もしくはアリル(3-アミノ-2-ヒドロキシ-1-プロピ

考えられ得ることではあるけれども、x, y, およびzのすべてが同時に同一のものであることはありそうにない。よりありそうなことは少なくともx, y, およびzのうち一つがモノ-ジ-, もしくはトリ-ホスフェイトのいずれかのホスフェイト含有基であり、そして少なくとも一つがHO-もしくはH-であることである。容易に評価されるように、最もありそうなzの正体は夫々リボヌクレオチドもしくはデオキシリボヌクレオチドを示しているHO-もしくはH-である。かようなヌクレオチドの例は5'-リボヌクレオチドモノホスフェイト, 5'-リボヌクレオチドジホスフェイト, 5'-リボヌクレオチドトリホスフェイト, 5'-デオキシリボヌクレオチドモノ^{ホス}フェイト, 5'-デオキシリボヌクレオチドジホスフェイト, 5'-デオキシリボヌクレオチドトリホスフェイト, 5'-P-リボヌクレオチド3P, および5'-P-デオキシリボヌクレオチド3Pを含む。より特殊な例はAがピオチンもしくはイミノピオチン、化学結合鎖が

ル) エーテル[NAGE]のような第一級アミン官能基を有するオレフィンを用いることが特に望ましいことが見出され、そして該オレフィンは例えば



特に構造式

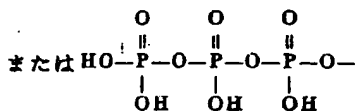
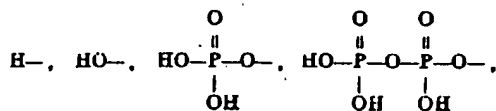


のような標準的なアミン変性反応によって探査子を結びつけることを可能にする。

調製の容易さのために、N H B-エステルを探査子の付加のために用いることが望ましいことが見出されている。しかしながら、例えばチオール、カルボン酸、エポキシドのような他の変性可能な官能基を有するオレフィン結合鎖手もまた用いられることが出来る。更にまた、結合鎖手と探査子の両方共が望ましいと思われるならば単一段階において付加されることが出来る。

し、もしBがプリンであれば該結合はプリンの8-位置に存し、もしBが7-デアザプリンであれば該結合は該デアザプリンの7-位置に存し、そしてもしBがピリミジンであれば該結合は該ピリミジンの5-位置に存するものと規定せられ、

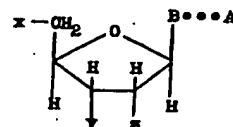
そしてx, y, およびzの各々は



を替わす。

を有する変性ヌクレオチドは

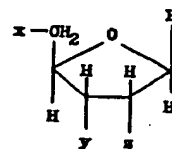
(a) 構造式



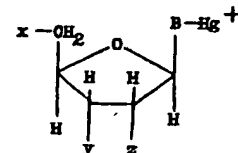
ここにBは糖部分のC⁸-位置に共有的に結合されたプリン、7-デアザプリンまたはピリミジン部分を表わし、Bがプリンまたは7-デアザプリンの時、該結合は該プリンまたはデアザプリンのN⁸-位置に存し、Bがピリミジンの時、該結合はN¹-位置に存するものと規定せられ、

Aは本化合物が二重螺旋構造のポリ核酸、デオキシリボ核酸複合体、またはDNA-RNA交配物中に取り入れられた時、ポリペプチドと共に検知され得る錯体を形成することの出来る少くとも3個の炭素原子からなる部分を表わし、

点線はBとAとからなる結合または組を表わ



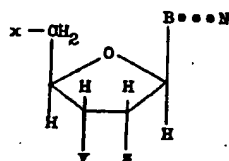
を有する化合物と水銀塩とを適当な溶媒中で適当な条件下において反応せしめて構造式



を有する水銀化合物を形成すること。

(b) 上記水銀化合物を該水銀化合物の-Hg⁺部分と反応し得、そして式・・・Nによって表わされる化学部分と反応せしめること、上記反応は水性溶媒中で、そしてK₂PdCl₄の存在下に、適当な条件下において行われ、構造式

以下に実施例を示す。



ここにNは反応性末端官能基もしくはAである。

を有する化合物を形成する。

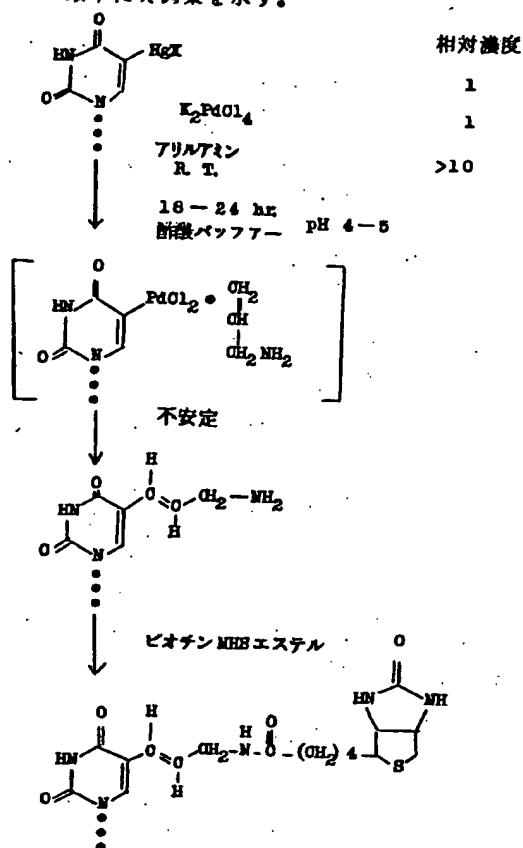
そして

(c) 該化合物を上記変性ヌクレオチドとして回収すること、NがAの時またはNが反応性末端基の時、該化合物は構造式M-Aを有する化合物、ここにMはNと反応可能な官能基を表わす、と水性溶液中適当な条件下において反応せしめられて上記変性ヌクレオチドを形成し、それから該変性ヌクレオチドが回収せられる。

以上の段階によって調製されることが出来る。

該反応はpH1と同程度に低い水素イオン濃度で、もしくはpH14と同程度に高い水素イオン濃度で行われることが出来るけれども、約4から8までの範囲において行うことが望ましい。このことはこの範囲以外のpHにおいては加水分解される例えばヌクレオシドポリホスフェイト、ポリヌクレオチド、およびヌクレオチド補酵素のような不安定な化合物を取扱かう場合には特に真実である。同様に標識付けされた有機基質の分解の可能性を防止するために約20℃から30℃の範囲の温度で行うことが望ましい。しかしながら、該反応は約5℃から100℃の温度で行われ得る。化学反応においては通常のことであるが、より高温は反応速度を促進し、そしてより低温はそれを遅くする。かくして5℃から100℃までの温度範囲において、最適反応時間は約10分から98時間迄変化するのであろう。望ましい温度範囲においては、反応時間は通常3から24時間迄変化する。

pHを所望の範囲に維持するための望ましい



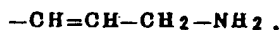
手順はバッファーを用いることによる。種々なバッファーが用いられ得る。これらは例えば、酢酸ソーダもしくはカリウム、クエン酸ソーダもしくはカリウム、クエン酸カリウム、トリス酢酸、そしてホウ酸、水酸化ソーダバッファーを含む。使用時のバッファーの濃度は約2.0モルまでの広い範囲にわたって変化し得る。

水酸化反応およびパラジウム触媒を用いる付加反応の特別な利点はこれらが水中で行われ得ることであるが、有機溶媒の少量が溶解性補助として有用に含まれることが出来る。通常選択される有機溶媒は水と混和性を有するものである。これらは例えばメタノール、エタノール、プロパノール、グリセリン、ジオキサン、アセトン、ピリジン、およびジメチルホルムアミドのようなエーテル、アルコール、エステル、ケトン、アミド等から選ばれるであろう。しかしながら、例えばメタノールのようなアルコールの存在は屢々オレフィン二重結合に対するアル

コキシ付加の原因となるので、溶解性補助として用いられる有機溶媒は注意深く選択されなければならない。アルコキシ置換基の α -または β -外環炭素原子に対する導入は糖々醇素基質として利用されて非常に効果の少ない化合物の生成の原因となる。

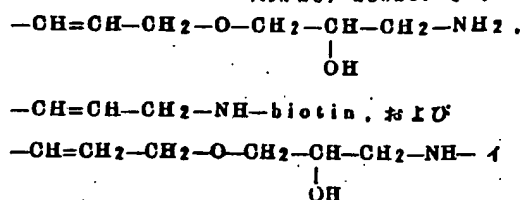
種々の水銀塩が利用されるけれども、現在望ましい塩は酢酸水銀である。また、前に示されたように、該化合物は先づ結合鎖手を付加し、そしてそれから部分Aを付加することによって、もしくは既に部分Aが結びついている結合鎖手を付加することによって調製される。かくして式 $\cdots N$ で表わされる化学部分は所望の化合物の形成を最終的にもたらすものであればいかなるものでもよい。

例としては



オチド誘導体に直接結びつけられているビオチン探査子を有することは遂行され得る実験原案においても、分析のために利用され得る検出方法（顕微鏡的および非顕微鏡的）においても可成り広範囲にわたる可能性を提供する。例えばビオチンヌクレオチドは細胞によって、もしくは粗細胞抽出物による合成過程に存するポリヌクレオチドの中に導びかれることが出来、かくして発生期（成長期）のポリヌクレオチド鎖を検出および／または単離することを可能ならしめる。このような手順はいかなる直接化学的変性方法によってもすることが不可能である。更に、酵素は例えばビオチンのような探査子をポリヌクレオチド中の高度に選択性のある、または位置特性のある配位の中へ導入するための試薬として用いられることが出来る。同様な探査子変性生成物の化学的合成はどうみても達成することが甚だ困難であろう。

ビオチンもしくはイミノビオチンを含むヌク



ミノビオチン、

を含む。

これらの反応において用いられる反応物の量は広く変化する。しかしながら水銀化されていない化合物、水銀化された化合物、およびパラジウム含有化合物の量は一般的に略化学量論的であるが、一方水銀塩および化合物 $\cdots N$ は過剰モル、例えば夫々の水銀化されている化合物もしくは水銀化されていない化合物のモルに対して $N \cdots N$ もしくは水銀塩の5~20モル存在せられる。実際には、量は反応条件や反応物の詳細な性質の変化によって変化する。

酵素基質として機能することが出来るヌクレ

クレオチドの合成は以下に記述される実施例において詳しく述べられるようにして達成される。C-5炭素原子に結びついているこれら探査子のいづれかを含むポリリマジンヌクレオチドは原始核もしくは真生核の両方に起因する精製された核酸ポリメラーゼの種々なものに対して優れた基質として役立つ。これらはE. ColiのDNAポリメラーゼI、バクテリオファージT4 DNAポリメラーゼ、ネズミ(A-9)およびヒト(HeLa)細胞からのDNAポリメラーゼ α および β 、そしてヘルペス単純ウィルスのDNAポリメラーゼを含む。確認データはBigby等のニック転換条件(P. W. J. Rigby, M. Dieckmann, Q. Blodes および P. Berg, J. Mol Biol. 113, 237, 1977.)もしくはBourguignon等によって述べられている間隔充填反応(G. J. Bourguignon, P. J. Tattersall および D. O. Ward, J. Virol. 20, 290, 1976.)のいづれかを用いることにより、E. coli DNAポリメラーゼについて得

られた。Bio-dUTP または Miller 等の方法 (M. B. Miller, J. C. Castellot, Jr. および A. B. Pardee, Exp. Cell Res. 120, 421, 1979.) によるリソレチンを用いた処理によって透過された CHO 細胞においても、そしてヘルペス単純ウィルス感染 BHK 細胞から調製された複製システムにおいてもポリメラーゼ基質として機能することが見出されている。ビオチン化リボヌクレオシドトリホスフェイトは *E. coli*、およびバクテリオファージ T7 の RNA ポリメラーゼに対する基質として機能することが見出されたけれども、これらのデオキシリボヌクレオチドトリホスフェイト相当物と同様を利用効率は低い。事実、それらは突触せられる真生核 RNA ポリメラーゼ (HeLa 細胞 RNA ポリメラーゼ I、子牛胸腺 RNA ポリメラーゼ I、およびマウス細胞 RNA ポリメラーゼ I) によって多少なりとも不完全に取り入れられる。この基質機能の限定された範囲はいくらかの生体的もしくは試験管的な転写研究において有用性を限定するの

であるが、ビオチン標識付けされた RNA 探査子は DNA 鋳型から *E. coli* もしくは T7 RNA ポリメラーゼを用いて、もしくは例えばビオチン化-pCp のような化合物と共に RNA リガーゼを用いる末端標識付け方法によって酵素的に調製され得る。UTP の AA- および NAG E 誘導体はしかしながら上記の真正核 RNA ポリメラーゼに対する基質である。これら類似物に対する抗体の有効性によれば、免疫学的もしくは親和力方法による発生期転写の単離は実行可能である。

ビオチンもしくはイミノビオチン置換体を含むヌクレオチドの酵素的重合はこれらの探査子のいづれもが放射性標識付けられてはいないので直接に監視されない。しかしながら実験的証拠の二つの系列は明らかにビオチン化ヌクレオチドが取り入れられたことを示している。第一はビオチンヌクレオチドの存在において合成されるポリヌクレオチドはアビデンもしくはストレ

プトアビデン親和性カラムでクロマトグラフした時、選択的に保持されていることである。

(第 I および II 表)。例えば ^{32}P -dAMP でニック転換された正常 DNA は 0.5 M NaCl の添加において定量的に流出するのに、ビオチン化 DNA もしくはイミノビオチン化 DNA の膨大な量が高濃度塩、尿素、グアニチン-HCl、ホルムアミド、もしくは 5.0 mM NaOH による長時間の洗滌の後ですらもレジンに結合して残っている。これら洗滌条件によって流出される放射性標識の少フラクションは二度目にレジンに対して適用された時には保持されず、放射性がビオチン置換の行われていない DNA 断片と結合されていることを暗示する。証拠の第二の系列は精製アンチ-ビオチン IgG、次いでホルマリン固定されたスタフィロコッカス アウレウスによって処理された時、ビオチン標識付けされたポリヌクレオチドのみが免疫沈殿されることである (第 III 表)。ビオチンの極めて少量がこの方法によって検知されることはこれら

表中のデータから明らかである。これら結果はまたもし抗体結合もしくはアビデン親和力方法が交配手法を用いる探査子検出において有用であればビオチン分子はアビデン、ストレプトアビデン、もしくは固有の抗体によって認められることが出来る一方、DNA はいまだその本来の、二重螺旋構造形態、即ち絶対的に本質的な条件下にある。

アピチン-セファロース上のピオチン
化 DNA の選択的保持性

流出物	レンジ上に保持されている DNA %
バイオ-DNA (1%)	T-DNA
負荷— 3×10^5 cpm 10 mM トリス 7.5 0.2 M NaCl	100 100 %
(1) 0.5 M NaCl	100 0.1
(2) 1.0 M NaCl	99.7 <0.01
(3) 8 M 尿素	100 <0.01
(4) 6 M グアニジン-HCl	95.2 <0.01
(5) 99 % ホルムアルデヒド	94.7 <0.01
(6) 2 mM ビオチン	97.6 <0.01
(7) 50 mM NaOH	89.5 <0.01

ストレプトアピチン-セファロース上の
イミノピチン-dUTPおよびイミノピチン
化 DNA の親和クロマトグラフ

流出物	8A-セファロース上に 保持される%		
	T-DNA	³ H-IB -dUTP	IB- DNA
負荷—10mM トリス-HCl, pH 8.3			
50mM NaCl	0.8	100	99.7
(1) 0.1 M NaCl	<0.1	100	99.7
(2) 1.0 M NaCl	<0.01	100	99.4
(3) 8 M 尿素	<0.01	97.5	98.5
(4) 6 M グアニジン-HCl	<0.01	97.0	97.0
(5) 50 mM NH ₄ -酢酸 pH 4.0	<0.01	<0.01	96.5
(6) 50 mM NH ₄ -酢酸 pH 4.0	<0.01	<0.01	<0.01
2 mM ビオチン			

第 II 表

アンチ-ピオチン IgG および スタブ アレックス
による BIO-DNA の選択的免疫沈殿

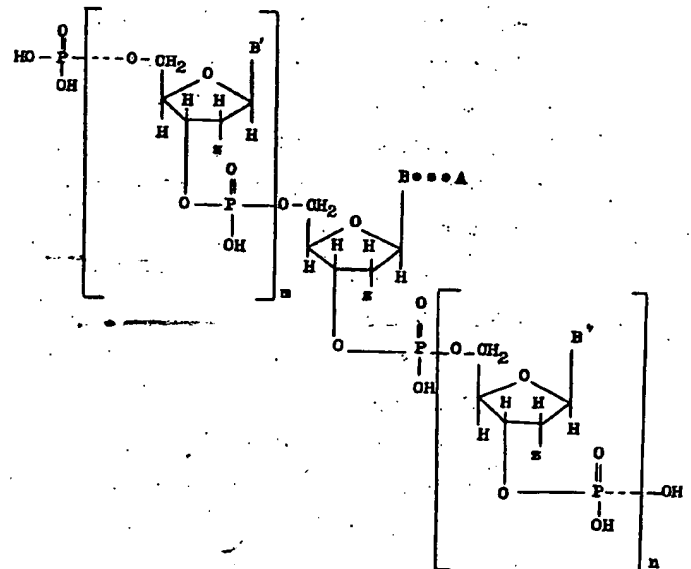
DNA*	抗体	免疫沈殿中 の CPM	上澄液中 の CPM
T-DNA	—	70	4867
T-DNA	抗-バイオ IgG	87	5197
T-DNA	非免疫 IgG	55	5107
バイオ-DNA	—	53	3886
バイオ-DNA	抗-バイオ IgG	3347	736
バイオ-DNA	非免疫 IgG	60	3900

* N. T. pBR-322 DNA, ³²P-標識
1% ビオチン置換体

相対活性 2×10^7 cpm/ μ g

ピオチン検出 0.001–0.01 ピコモル

かくして構造式



ここに B, B', および B'' の各々は糖部分の
C'—位置に共有的に結合されたプリン, デア
ザプリン, またはピリミジン部分を表わし、

B, B', または B'' のいずれかがプリンまたはデアザプリンの時、該結合は該プリンまたはデアザプリンの N⁹-位置に存し、B, B', または B'' のいずれかがピリミジンの時、該結合は N¹-位置に存するものと規定せられ、

A は本化合物が対をなすリボ核酸またはデオキシリボ核酸分子によって形成される二重螺旋構造の中に取り入れられた時、ポリペプチドと共に検知され得る錯体を形成することの出来ることも 3 個の炭素原子からなる部分を変わし、

点線は B と A とからなる化学結合または組を変わし、もし B がプリンであれば該結合は該プリンの 8-位置に存し、もし B が 7-デアザプリンであれば該結合は該デアザプリンの 7-位置に存し、そしてもし B がピリミジンであれば該結合はピリミジンの 5-位置に存するものと規定せられ、

x は H- または HO- を表わし、

そして m と n は 0 から約 100,000 までの整

数を表わす、

を有する新規な化合物を調製することが可能である。

勿論、その場合には該化合物は単に前述したように変性ヌクレオチドになるから、一般的には m および n は同時に 0 ではないことは容易に理解せられるべきことである。一般的に B および B' は同じオリゴもしくはポリヌクレオチドの中において変化し、夫々ウラシル、シトシン、チミン、グアニン、アデニン等となる。また一般的に、該変化はよく知られている遺伝コードによるペプチド合成に対するコードを行方ヌクレオチドの整列された連鎖に一致するだろう。しかしながら、示される該構造はまたもし本発明によって核酸が変性されることのみであれば、子牛胸腺 DNA, *E. coli* もしくはイーストの RNA, バクテリオファージ RNA および DNA (B17, fd), 動物ウィルス (BV40 DNA), 染色体 DNA 等のみならず、例えば

ポリ c, ポリ u, ポリ r (A-U) およびポリ d (A-U) のようなポリヌクレオチドをも包含することを留意すべきである。

該構造は例えば 2 から 30 の変性ヌクレオチドからなるオリゴマーもしくはポリマー中に存在する一つ以上の変性ヌクレオチドを含むこともまた理解されるべきである。この配座における重大な因子は変性の数があまり大ではないのでポリヌクレオチドは意図された用途には効果がないことである。

最後に変性オリゴもしくはポリヌクレオチドは共同して末端基が相溶性もしくは反応性を与えられる限りにおいて同一構造を有するより強い実体を形成し得ることは理解せられるべきである。

これら化合物は適当な条件下で合成を指揮する核酸鋳型の存在下において適当な核酸、特に

ヌクレオチドトリホスフェイトの酵素的重合によって造られ得る。このような条件は用いられる酵素、存在するヌクレオチドの量、そしてその他の変数によって広く変化する。酵素の実例は *E. coli* の DNA ポリメラーゼ、バクテリオファージ T4 DNA ポリメラーゼ、ネズミおよびセト (*HeLa*) 細胞からの DNA ポリメラーゼ α および β 、ヘルペス単純ウィルスからの DNA ポリメラーゼ、*E. coli* の RNA ポリメラーゼ、バクテリオファージ T7 の RNA ポリメラーゼ、*HeLa* 細胞 RNA ポリメラーゼ II、子牛胸腺 RNA ポリメラーゼ II、およびマウス細胞 RNA ポリメラーゼ I を含む真生核 RNA を含むものである。

また該化合物はオリゴもしくはポリヌクレオチドを末端付加して付加が 5' もしくは 3' 位置に行われるかどうかによって m もしくは n が 0 である化合物を形成することによって調製されることが出来る。更に塩基がビオチン化され

ている例えば pCp もしくは pUp のような化合物は酵素 RNA リガーゼを用いて目下の分子に付加され得る。

変性オリゴおよびポリヌクレオチドはまた前記した個々のヌクレオチドの変性のための方法を目下のオリゴもしくはポリヌクレオチドの化学的変性によっても調製され得る。

本発明の種々な変性ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、およびポリヌクレオチドはもし該ポリペプチドが一つの錯体もしくは複数の錯体が形成される時に一般的に通常の検出手法によって検出され得る一個もしくはそれ以上の部分を含んでいるとすれば適当な条件下で該化合物をそれらと錯体を形成し得るポリペプチドと接触させて錯体を形成させることによって検出されるであろう。

ビオチン型探索子に対する一つのポリペプチ

J. Cell. Biol., 73, 783, 1977; E. A. Bayer および M. Wilchek, Methods of Biochemical Analysis 26, 1, 1980.) アビデンは 1.05 の pI を有する塩基性蛋白質であるから、そのヒストン様特性またはその炭水化合物部分はこれら観察される非特定相互作用に対して最も責任がありそうである。

ビオチン含有ヌクレオチドおよびその誘導体に対する望ましい探索子は土壌菌、ストレプトミセス、アビデニによって合成されたアビデン様蛋白であるストレプトアビデンである。その調製と精製は Hoffman 等、Proc. Natl. Acad. Sci., 77, 4666 (1980) に記載されている。ストレプトアビデンはより低い pI (5.0) を有し、グリコシル化されておらず、そしてアビデンよりも DNA に対するより非常に低い非特定結合性を示し、そしてそれ故に核酸検出方法論を含む応用において潜在的な利点を提供する。

D 検出子はアビデンである。アビデン-ビオチン相互作用は自然にみられる最も強固な非共有結合定数 ($K_{dis}=10^{-15}$) の一つを示す。もしアビデンが例えば蛍光染料 (フルオロセイン、ローダミン)、高電子密度試薬 (フェリチン、ヘモシアニン、金コロイド) もしくは不溶性反応生成物を沈積し得る酵素のような潜在的に明瞭な指示分子と結合されたならばビオチン探索子の位置のおよび/または量的存在は設定せられるであろう。

アビデンは不率にも核酸もしくはクロマチン物質と連絡せられて用いられる時、ビオチン-指示蛋白質としては余り望ましくなくなる一つの性質を有している。アビデンが濃縮クロマチンもしくは核酸の大量を含む副細胞区画に対してビオチン結合性質から独立した様式で強固に結合することは報告されている (M. H. Hoggeness, Stain Technol., 52, 165, 1977; M. H. Hoggeness および J. F. Ash,

ビオチン様探索子検出に対する最も望ましい蛋白質は単一特定ラビット IgG, アンチビオチン免疫グロブリンである。この化合物は前述のように (M. Berger, Method in Enzymology, 62, 319 「1979」)、ビオチンとウレ科血清アルブミン変性ビオチンによって免疫化されたラビットによって調製せられ、そして親和性クロマトグラフによって精製せられる。免疫グロブリン-ハプテン会の結合定数はアビデン-ビオチン錯体に対してよりも可成り低い K_{assn} (10^8 から 10^{10}) 値を有するけれども、それらはアビデン-イミノビオチン錯体で観察される値と略等しい。更にアンチビオチン抗体はもしあったとしても抗体とクロマチン物質との非特定結合は僅かしか超らないので生体内原位置交配による染色体上の特定ポリヌクレオチド連鎖の検出において非常に有用であることが証明されている。

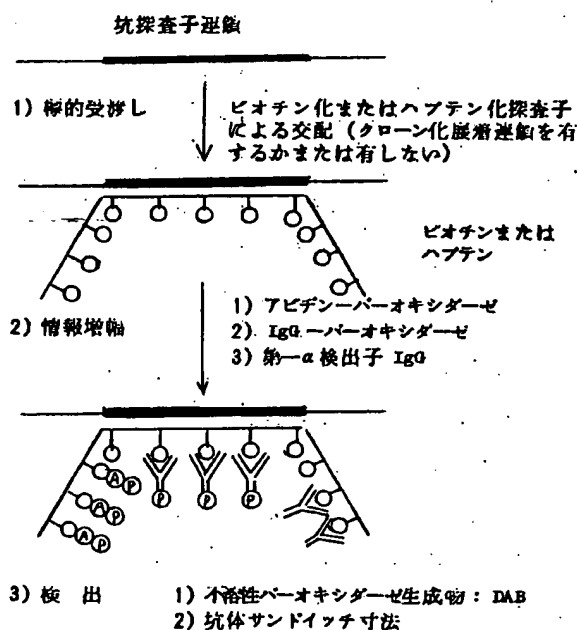
本発明の変性ポリヌクレオチドは交配探索子

としてこれらの使用に適合する条件下において変質および回復の能力を有する。熱的変質の様相といくらかのビオチン置換DNAおよびRNAポリマーの交配特性の分析は明らかにこれを示す。例えば、ニック転換を行ってキロベースに対して約10~100ビオチン残基を導入したpBR322 DNAもしくはλ DNAは対照のビオチンを含まないDNAのT_m値と本質的に同一であるT_m値を有する。更に³²P-標識付けされたビオチン置換体pBR322 DNAはプラスミドを含むバクテリア群の検出に対する交配探査子として用いられた時、対照であるチミジン含有DNAと同様な程度の特性および自動放射線記録信号強度を示した。

一本の糸(5 kbに対して全体で1250)におけるすべてのチミジン残基がビオチン化ヌクレオチドによって置き換えられる例えばMVF₂LLF DNAのようなDNA複合体においては、該T_mは置換されていない対照のそれよりも小

図示される。

生体内原位検出もしくは北方/南方交配方法による探査子検出に対する一般的原案



さくたった5℃である。各々の塩基対が一つのbio-dUMP残基を含んでいるポリd(A-bioU)のT_mはポリd(A-T)対照よりも低い15℃であるけれども、変性および回復の両方の間に観察せられる協調性の度合および紫外線吸収性の範囲は該二つのポリマーに対するものと同じである。RNA複合体とDNA/RNA交配体の平行分析はこれらのT_mの値がポリマーのビオチン含有量の増加にともなってまた減少するということを示している。しかしながらビオチン分子の実質的な数がポリマーの交配特性を顕著に変えることなく導入されることが出来ることは明らかである。

これらの結果はビオチン置換ポリヌクレオチドが染色体、固定細胞において特定のポリヌクレオチド連鎖を検出および/または位置決めするための探査子として用いられ得るのであることを強く示唆するものである。ビオチン置換探査子を検出するための一般的な原案は以下に

この一般的な図は遺伝子地図(細胞遺伝学的)および再結合DNA手法に対して用いられた手順のみを説明するものである。しかしながら臨床試料におけるバクテリア、ウイルス、菌、もしくは寄生源の核酸連鎖の検出に対してそれは同様都合よく適用され得、そしてこれは放射性同位元素の使用に依存しない臨床診断に対する有力な新しい方法の基礎を形成する。

ビオチンの検出に対する免疫学的および組織化学的方法は該基礎的方法が生体内交配の遺伝子地図を作成する迅速な方法および汚染交配方法による特定核酸連鎖の検出のための非放射能性手順のために使用可能であることを示している。用途は新しい臨床診断手順の開発におけるこの手法からなるものである。

この方法を用いれば、特定デオキシリボ核酸またはリボ核酸分子、特に例えばバクテリア、菌、ウイルス、イーストもしくは哺乳類から誘導され

る分子の存在を測定することが可能である。これは患者もしくはその他の被検体における核酸含有病因の順次の診断を可能ならしめる。

更に抗体耐性を測定することはバクテリアのスクリーニングに対する方法を提供する。かくして、例えば、ストレプトコッカス ビオグネスもしくはネイセリヤ meningitidisにおけるペニシリン耐性、スタフィロコッカス アウレウス、カンジダ アルビカンズ、プシュードモナス アエルギノザ、ストレプトコッカス ビオグネシスもしくはネイセリヤ gonorrhoeaeにおけるテトラサイクリン耐性、およびミコバクテリウム テューバキュロシスにおけるアミノグリコシド耐性は測定されることが出来るのである。

これらの方法においては、生物もしくはその抗生物質耐性を特徴づける核酸連鎖と対をなす。そして更に本発明による変性核酸の一つもしくはそれ以上を含むポリヌクレオチドが調製される。このポリヌクレオチドは 精査 下において生物

体細胞遺伝の手法を主として含む冗長な時間を消費する仕事であった。生体内^(原位置)交配は例えばドロソフィラのような染色体ポリテン化を受ける種において、一重複写遺伝子連鎖の地図を作成するためには首尾よく用いられて来たけれども、大部分のより高度な真生核染色体における特有の連鎖遺伝子の検出は例え不可能ではないにしても標準交配方法を用いては著るしく困難であった。非常に高度に特定されている放射性のポリヌクレオチド探査子が交配位置の自動放射能記録位置決めを容易にするための必要性はまた探査子の急速な放射性分解と、銀粒状沈降物の背後ノイズにおける付随的な増加を招来する。低度から中度の特定放射性を有する交配探査子の使用は例えばリボソーム RNA 遺伝子もしくは衛星 DNA のような多重複写連鎖を検出する場合でさえも、多くの日数もしくは週にわたる曝露時間を必要とする。再結合 DNA 手法は真生核細胞中に見出される殆んどすべての一重複写連鎖の分子クローン化を実行可能しているから、かようなクローン化された遺伝的

から得られた核酸によって交配される。交配のための欠陥は生物もしくは耐性特性の不在を示す。

交配された核酸複合体はそれから該複合体と検出可能な部分を担持する適当なポリペプチドとの錯体を形成し、そして適当な検出手法を使用して該錯体の存在を検出することによって識別される。陽性検出は錯体、複合体、そしてそれ故に関心のある核酸連鎖が存在することを示す。

この方法は例えばサラセミアおよび鎌状細胞貧血症のような遺伝的不調の診断に拡張され得る。その存在もしくは不存在が該不調と関連している(サラセミアの場合)デオキシリボヌクレオチド遺伝子連鎖は適当な検出可能なポリヌクレオチドによる錯体形成に基づく本発明によるポリヌクレオチド探査子との下記の交配によって検出されることが出来る。

遺伝子の地図を作成することもしくは染色体上の特定の位置に対するこれらの転写は細胞融合や

断片の染色体起原の地図を作成するための迅速なそして鋭敏な方法を有することは非常に有益なことである。

変性ヌクレオチドは放射性同位元素の使用を回避する生体内原位置交配による遺伝子地図の作成において用いられるであろう。この手順は DNA 探査子の中へニック転換によって酵素的に取入れられ得るビオチンを含むチミチン類似物を利用する。生体内原位置交配の後、ビオチン分子は精製されたラビットアンチ-ビオチン抗体の親和力のための抗原として役立つ。フルオレセイン標識付されたヒツジのアンチ-ラビット IgG と共に形成される免疫蛍光抗体サンドイッチは緑-黄バンドとしてクローン化された遺伝子連鎖の迅速なそして明確な細胞遺伝学的位置決めを準備する。この方法は生体内原位置遺伝子位置決め用の通常の自動放射能記録方法に比してより少ない背後ノイズ、バンド間の分解能力の向上、探査子交配の位置測定に要する時間の短縮、そして化学的に安定な交

配検査子という四つの主な利点を提供する。この方法はドロソフィラ ミラノガスターのポリテン染色体およびマウス中期染色体上の衛星 DNA における反復されたそして独特な DNA 連鎖の位置決めに対して首尾よく適用されて来た。

かくしてポリテン染色体が生体内原位置遺伝子地図作成に対する間接的免疫蛍光性によって検出されるのであるが、本発明による変性ヌクレオチドを用いた検査子の効能を証明するための試験システムとして用いられることが出来ると言うことは見出されている。該検査子は例えば約5から約22 キロベースの範囲の大きさの挿入によるプラスミドベクトルの中におけるクローン化された tRNA 遺伝子のようなオットー シュミットおよびディーター ゼルから得られたクローン化ドロソフィラ連鎖の変種を含んでいた。これらクローンの多くのものは既に放射性同位元素を用いた通常の生体内原位置交配方法によってドロソフィラ染色体地図上に特有なバンドを割当てられている。

夫々 5kb と 22kb 挿入を含むプラスミド pBR 17D と pPW 539 がこの方法によって交配された時、交配のパターンは広がりから広がりへ再現され、そして与えられたスライド上に染色体拡がりの 90% 以上が明瞭に観察されることが見出された。

クローン化されている置換可能要素 pAC 104 はドロソフィラゲノムに沿って多くの位置に地図を形成するものとして知られている。この検査子の生体内原位置交配によって得られた自動放射能記録と蛍光写真の比較はこの方法の大きな利点、即ち銀粒の拡散地域が自動放射能記録上に現われる所に二重または一連のバンドが免疫蛍光標識付けによって識別出来るということを示す。

この方法の他の直ちに明らかな利点は間接免疫蛍光によってなされるべき遺伝子指定に必要とされる時間における著しい短縮である。特定バンドに対する DNA 断片の指定は 6 時間の交配の

DNA 検査子は Bio-dUTP の存在下においてニック転換せしめられた。時々 $^3\text{HdATP}$ および/または $^3\text{HdCTP}$ が該ニック転換反応混合液中に含まれた。このことは単一染色体広がり上の連鎖の自動放射能記録および免疫蛍光的の双方の位置決めを可能にする。生体内原位置交配は M. L. Pardue, および J. G. Gall, Method in Cell Biol., 10, 1 (1975) 中に記載されたと同様に遂行された。交配されていない検査子を除去するための最後の 2x SSC 洗滌の後、スライドは PBS (磷酸で緩衝化された塩類) で洗われ、そして PBS および 10 mg/ml BSA 中の 2.5 $\mu\text{g/ml}$ ラビットアンチ-ビオチンと共に 37°C 2~16 時間養生された。これにつづいて該スライドは FITC 標識付けされたヒツジアンチ-ラビット IgG (Miles Laboratories, PBS および 10 mg/ml BSA 中 1:100 に希釈されている) と共に 1~4 時間養生された。エバンス ブルーは蛍光照明によって染色体を見るために赤色逆着色剤として必要とせられる。

範囲でなされることが出来る。これは自動放射能記録曝露方法に必要とされる数日間もしくは数週間と比べれば明らかである。この要因は分解能の向上と合わせて間接免疫蛍光によって検出される変性ヌクレオチドの使用をこれより従前の方法に比して直接より望ましいものとしているのである。

この免疫学的方法はまた衛星 DNA がマウス中期染色体の動原体領域の地図を作成したところの哺乳類染色体を動かすことが示されている。該結果はヒトおよびその他の哺乳類からの染色体中の単一複写(独特)連鎖のための単一遺伝子地図作成手順の開発に対する基礎を提供する。かような手順は染色体の遺伝的構成についての我々の理解を極めて容易にしそして臨床細胞遺伝的診断をより迅速かつ實際化するものである。

染色体拡がりからラビットアンチ-ビオチン IgG と共に交配の後に注目される単一段階抗体サンディッチ方法は成功はするであろうが、この原

案は明確な遺伝子指定のために充分な蛍光を発しない。しかしながら、Lamm等(1972)、Wofsy等(1974)によって記述された「ハプテン-抗体サンドイッチ手法」を用いることによってより強力な蛍光的信号が得られることが出来る。この手順においては第一次抗体、我々の場合は単一種の、即ちラビット アンチ-ビオチン IgG は望ましくは免疫グロブリンが一つの抗原親和性カラム(ビオチン-セファロースTM)に結びついている間に例えば2,4-ジニトロフルオロベンゼンのようなハプテン化試薬によって化学的に変性される。15~20だけのハプテン(DNP)グループが親和性もしくは特性を拘束しているその抗原を減少することなくして第一次抗体に結合されることが出来る(Wallace および Wofsy, 1979)。該試験試料の第一次抗体処理に続いて蛍光標識付けされたアンチ- IgG よりもむしろ蛍光標識付けされたアンチ-ハプテン IgG 抗体と共に養生が行われるならば、蛍光信号における5から7倍の増加が得られることが出来る。また単一種のギ

点はハプテン- IgG 相互作用の会合常数が 10^7 から 10^{10} であるのに対してビオチンに対するその親和性は $K_{assn} = 10^{15}$ であることである。迅速な反応速度と莫大な親和性はビオチン化された探査子の位置決めに要する時間が免疫学的試薬における時間単位に対してストレプト アビデンにおいては分単位になることであろう。

ストレプト アビデン検出システムの最初の評価は現在進行中である。ビオチン化 DNA 探査子と交配されたポリテン染色体はストレプトアビデンと共に養生せられ、次いでビオチンおよび FITC (FITC, ビオチン化-BSA) で二重に標識付けされたウシ血清アルブミンと共に後養生されるであろう。四つのストレプトアビデン副単位のうちの只一つだけが各々のビオチン化 DNA 位置の結合の中に含まれることが可能であると思われるから、一つの標識付された BSA 分子が該ストレプトアビデン-ビオチン化ヌクレオチド錯体のうちの残存する三つの非共役副単位の各々と

ニアビグ アンチ-DNP IgG が利用出来るので、我々はこの第二次抗体をビオチンでハプテン化しかくして二つのアンチ-ハプテン- IgG 集団、DNP-標識付けされたアンチ-ビオチン IgG とビオチン標識付けされたアンチ-DNP IgG とを作ることが出来る。もしこれらがハプテン-抗体サンドイッチを行なうために交互に用いられ、そしてそれから多くの哺乳動物種からの IgG 分子に固有的に結びついているスタフィロコッカス アウレウスからの蛍光標識付けされた蛋白質Aに従がわれるならば、それは付随の有用性と共に第一次抗体信号の莫大な増幅を結果として生ずる。

ストレプトミセス アビデンからの蛋白質ストレプトアビデンは結合された可視化システム(例えば蛍光探査子(上)もしくは組織化学試薬(下))を交配されたビオチン含有ポリヌクレオチドの位置に対して固有的に指向を行なうための乗物として可能性ある選択物である。アンチ-ビオチン IgG に対してストレプトアビデンが優る一つの

結合することが出来る可能性を有する。この単一ストレプトアビデン+FITC, ビオチン化BSAからの蛍光信号は先に述べた基礎の「抗体サンドイッチ方法」を用いて対照と比較されるであろう。

もし「抗体サンドイッチ」とストレプトアビデン+FITC, ビオチン化BSA検出強度が比較出来るならば、ストレプトアビデン+FITC, ビオチン化-BSAシステムは多重「ハプテン-抗体サンドイッチ」方法と匹敵する様式で単一複写の複写感度に迄高めることが企てられ得る。BSA上のビオチン基のいくらかのものはストレプトアビデンの第一層には結合されていないので、ストレプトアビデンの第二層は充分な信号が得られるまで付加されることが出来る。例えばもし第二層において只二つのストレプトアビデンプロモーターが第一層BSAの各々と結合しそしてこれらストレプトアビデンプロモーターの各々が三つのFITC-ビオチン化BSA分子と結合するならば、第二層強度は第一層からのその二倍になり、第

三層に対しては化学量論的に結合している類似物と共に蛍光強度は第一層のその12倍になり、それ故に全強度は引続いて加えられる層と共に急速に増加するであろう。

結び付けられている蛍光物質とビオチン探査子の量を最大にするためにBSAよりもむしろ甲状腺グロブリンのような大きな担体蛋白質が用いられる計画がある。ビオチン探査子と担体蛋白質との間のより長い結合鎖手を用いることはまた必要であろう。より長い結合鎖手はビオチン化された蛍光性担体分子を各々の非共役ストレプトアビジン副単位に理論的に配達することを分子空間的に最適化し、そして該ビオチン化された蛍光性担体と結び付くであろう後続の層におけるストレプトアビジンプロモーターの数を最大にする。先のように、適当な対照は蛍光探査子とビオチンを有する担体蛋白質の置換は溶解性および/または非特異結合問題を生じない。

ストレプトアビジン-担体配達システムはその

試薬を用いる「ヘプテン-抗体サンドイッチ」手法において、またパーオキシダーゼの場合はパーオキシダーゼ炭水化物部分をアルデヒドに酸化しそしてこれらの残渣を所望の蛋白質の「アミノ基」と結合することによって蛍光探査子の代りに最終的な抗体に結合せしめられ得る。ストレプトアビジン-ビオチン化担体蛋白質方法に対しては、それと結合されるビオチン基を有する酵素は蛍光的にビオチン化された担体システムを置き代えることが出来た。交互に該酵素はビオチン化されたBSAもしくは甲状腺グロブリンを用いて先の層の中に形成されたストレプトアビジン位置の増幅をともなってビオチンによってストレプトアビジンの最後の層に結合され得た。我々は必要な組織化学的試薬および生体内原位置交配を背後問題なくして可視化するための適当な基質/不溶解生成物結合体の開発に間もなく着手するであろう。信号増幅に対する組織化学的研究はそれ故に1981年の夏に試験の準備がなされるべきである。

配達速度に加えて免疫蛍光方式と比べて二つの重大な利点を有する。第一に、只二つの蛋白質成分が層形成に必要とされるのみである。第二に、只一つの担体蛋白質が変性のために必要でありそしてそれは官能性を維持する必要がなくまたはビオチン基と同程度の長さの全構造形態でさえもストレプトアビジンに接近し得る。

交配された探査子を可視化するための蛍光方法の一つの選択されたものは例えばパーオキシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼのアルカリホスファターゼのような酵素を可溶性基質を不溶性着色沈着物に酵素的に転換することが顕微鏡で可視化せしめられ得る交配位置に指向することである。この手法の重要な利点は組織化学的方法が蛍光検出よりも10から100倍以上敏感であることである。加うるに、着色沈物は広範囲にわたる光曝露によっても色があせず、かくして蛍光顕微鏡検査の一般的な欠点を回避するものである。これら酵素は例えばグルタルアルデヒドのような二官能性

蛍光の非常に低いレベルを検出および/または推定することはレーザおよび光増感剤からなる現在用いられている像増強物もしくはシステムを用いることによって可能である。これらの方法は個々の光子のレベル程度に低い光の検出を可能ならしめる。像の例えば各々の映写像である各々の点が目的物の点によって発せられる光子の数に厳密に比例する適当なディジタル処理システムによって、像が形成されることが出来る。この種のシステムもしくは細胞の全部もしくは一部がレーザ光線通り過ぎて流動する流動システムを用いて、100から目視で検出され得る1000以上までの間の因子からの蛍光物質に対する検出感度増強が得られることが出来る。この増強は単一複写遺伝子の蛍光を検出するに充分である。

望ましい変性において、アリルアミン結合鎖手を介してビリミジン環のC-5位置に共有的に結合されているビオチン分子を含むdUTPおよびUTP類似物は合成されている。これらビオチン化-ヌクレオチドは試験管内でのDNAおよび

RNA ポリメラーゼの種々のものに対する効果的な基質である。ビオチン置換体の低レベル(50分子もしくはそれ以下/キロベース)を含んでいるDNAは置換されていない対照DNAのそれから区別することの出来ない変性、再合同、そして交配特性を有する。

かくして本発明はまた染色体核型形成の方法を提供する。この方法においては、変性されたポリヌクレオチドが既知の遺伝子に相当しそして変性ヌクレオチドを含む変性ポリヌクレオチドが調製される。これらヌクレオチドは染色体デオキシリボ核酸と交配せられ、生じた複合体は適当な条件下において適当なポリペプチドと接触せしめられ、錯体を形成する。該ポリヌクレオチドは検出可能な部分を含み、それ故に該錯体の位置は測定が可能でありそして固有な遺伝子の位置はそれによって固定される。

本発明の他の実施例はウラン塩基のいくらか

核酸と対をなすポリヌクレオチドの調製によって診断され得る。かくして交配複合体の交配および検出は腫瘍細胞の検出のための方法を提供する。

以下の実施例は本発明の種々の様相を説明するためのものであるが、「特許請求の範囲」中に記載されるよりも本発明の技術的範囲をより詳細に如何なる方法においても制限する意図を有するものではない。

実施例1および2

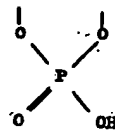
ビオチン化-UTPとビオチン化-dUTPの合成

(a)水銀化ヌクレオチドの調製

UTP (570mg, 1.0ミリモル)もしくはdUTP (554mg, 1.0ミリモル)が0.1M酢酸ソーダバッファーpH 6.0の100ml溶解されそして酢酸水銀(1.59gm, 5.0ミリモル)が添加

特開昭57-209297 (34)

が変性されて探査子を含むポリUを用いるポリA含有連鎖の検出を含む。更に他の実施例では、 α および β のうちの二つが反応せしめられて環状部分



を形成する環状変性ヌクレオチドを含む。

このような環状変性ヌクレオチドはそれから極もしくは腫瘍細胞を検出する方法として順次に行われる細胞表面上のホルモン受入れ位置の識別のために用いられる。

最後に、腫瘍細胞は本発明によって変性され、例えば α -胎児蛋白質もしくは癌胚種抗原のようなポリペプチドの生成に関連するデオキシリボ核酸遺伝子連鎖から合成され、その存在が特定の腫瘍細胞に対する診断に役立つメッセンジャーリボ

された。該溶液は50℃で4時間加熱せられ、それから氷上で冷却された。塩化リチウム(392mg, 9.0ミリモル)が添加せられそして該溶液は酢酸エチルの等量によって6回抽出せられて過剰の $HgCl_2$ を除去された。該抽出過程の効率は4,4-ビス(ジメチルアミノ)-チオベンゾフェノンを用いて有機層中の水銀イオン濃度を測定することによって監視された(A. N. Christopher, Analyst, 94, 392 (1969))。Dale等(R. M. K. Dale, D. C. Ward, D. C. Livingston, および E. Martin, Nucleic Acid Res. 2, 915 (1975))によって述べられているように水性溶液の一部をとってそれをヨウ素化し、その後分光分析を行なうことによって測定せられたヌクレオチド水銀化の程度は通常90から100%までの間であった。水性層中の該ヌクレオチド生成物は酢酸エチル抽出の間に炭素を濁るようになるのであるが、氷冷エタノールの3倍量の添加により沈澱せられそして遠心分離によって集められた。沈澱物は氷冷エタノールで二

回、エチルエーテルで一回洗滌せられ、そしてそれから風乾せられた。かくして調製せられた水銀化ヌクレオチドは更なる精製を行なうことなくしてアシルアミン-ヌクレオチドの合成に用いられる。

(b) アシルアミン-dUTP およびアシルアミン-UTP の合成

水銀化ヌクレオチド(段階a.)はpH 5.0の0.1 M酢酸ソーダバッファー中に溶解せられそして20ミリモル(267nmで200 OD/ml)に調節された。水性酢酸中の酢酸アシルアミンの新らしい20モル溶液が1.5mlのアシルアミン(133ミリモル)を8.5mlの氷冷4M酢酸にゆっくり添加することによって調製せられた。中和されたアシルアミンストックの3ml(6.0ミリモル)かヌクレオチド溶液の2.5ml(0.5ミリモル)に添加された。4mlの水中に溶解された K_2PdCl_4 (163mg, 0.5ミリモル)の一つのヌクレオチド相当量が添加せられて反応が開始された。パラジ

での逆相-HPLCクロマトグラフィーによって行われた。5-(9-アミノプロペン-1-イル)ウリチン(ウリチンのアシルアミンアダクト)の5'-トリホスフェイトが該HPLCカラムから流出されるべき最後の部分でありそしてこれらはいまだ特性付けされていないけれども三種の夾雑物から明確に分離せられた。これらヌクレオチドはプロトNMR元素分析によって(AA-dUTP ($C_{12}H_{16}N_3O_{14}P_3Na_4 \cdot 1H_2O$): 理論値, C, 22.91; H, 2.88; N, 6.68; P, 14.77. 換算値, C, 23.10; H, 2.85; N, 6.49; P, 14.75. AA-UTP ($C_{12}H_{16}N_3O_{15}P_3Na_4 \cdot 4H_2O$): 理論値, C 20.61; H, 3.46; N, 6.01; P, 13.8. 換算値 C, 20.67; H, 4.11; N, 5.39; P, 13.54)であるとスペクトルの的にそしてクロマトグラフ的に特徴付けられた。

(c) AA-dUTPまたはAA-UTPのビオチン化
ビオチン化-N-ハイドロキシサクシミドエステル(NHSB)は前述したように(H.

ウム塩(アルファ-ペントロシ)の添加において、反応容器の壁面に生ずる金属(HgおよびPd)沈着物によって溶液は次第に黒色に変化した。18~24時間室温に放置した後、該反応混合物は0.45mm膜フィルター(ナルゲン)を通して残存する金属沈着物の殆んどを除去した。該黄色溶液は5倍に希釈せられDEAE-セファデックスTMA-25(Pharmacia)の100mlカラムに適用された。pH 5.0の0.1 M酢酸ソーダの1カラム容量による洗滌の後、該生成物はpH 8~9の酢酸ソーダもしくはpH 7.5の重炭酸トリエチルアンモニウム塩のいずれかの1:6線型勾配(0.1~0.6モル)を用いて流出せしめられた。所望の生成物は0.30と0.35 M塩の間に流出する主UV吸収部分中に存在した。スペクトル分析はこのピークが幾らかの生成物を含んでいることを示し、最終的な精製はpH 3.3の0.5 M $NH_4H_2PO_4$ バッファー(分析的分離)もしくはpH 4.3の0.5 M酢酸トリエチルアンモニウム(予備分離)のいずれかを用いてPartisil-ODS 2のカラム上

HeitsmannおよびF.M. Richards, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 71, 3537(1974), ビオチン(Sigma)から調製せられた。AA-dUTP $\cdot H_2O$ (63mg, 0.1ミリモル)もしくはAA-UTP $\cdot 4H_2O$ (70mg, 0.1ミリモル)がpH 8.5の0.1 Mホウ酸ソーダバッファーの20ml中に溶解せられ、そしてジメチルフォルムアルデヒドの2ml中に溶解せられたNHSB(34.1mg, 0.1ミリモル)が添加された。反応混合物は4時間室温に放置されそしてそれからpH 7.5の0.1 M TEABによって予備平衡化されているDEAE-セファデックスTMA-25の30mlカラム上に直接負荷された。該カラムはTEABの400ml線型勾配(0.1~0.9M)によって流出された。0.55と0.65 M TEAB間に流出したビオチン化-dUTPもしくはビオチン化-UTPを含む区画はメタノール存在下でロータリーエバポレーションによって脱塩せられそして水に再溶解された。時々若干濁った溶液が得られた。ある種のTEAB溶液中の夾雑物の故であるこの濁りは

0.45mmフィルターを通して戸過することによって除去された。長期間の貯蔵に対しては、該ヌクレオチドはDowex TM 50 (Na^+ 型)の存在中で該溶液を短時間攪拌することによってソーダ塩に変換された。戸過の後、該ヌクレオチドは冷エタノールの3倍量の添加によって沈澱せしめられ、エチルエーテルで洗滌せられ、水酸化ソーダペレット上で真空乾燥せられ、そして -20°C でデシケーター中にて貯蔵された。直接の使用に対しては、該ヌクレオチド溶液はpH 7.5のトリス-HCl中に20mMとされそして最終ヌクレオチド濃度を5mMに調節される。ストック溶液は -20°C にて凍結貯蔵される。

該bio-dUTPおよびbio-UTP生成物の元素分析は次の結果を得る。Bio-dUTP ($\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{N}_5\text{O}_{18}\text{P}_3\text{S}_1\text{Na}_4 \cdot 1\text{H}_2\text{O}$): 理論値: C, 29.80; H, 3.38; N, 7.89; P, 10.47; S, 3.61. 根拠値: C, 30.14; H, 3.22; N, 7.63; P, 10.31; S, 3.70. Bio-UTP ($\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{N}_5\text{O}_{19}\text{P}_3\text{S}_1\text{Na}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$): 理論値: C, 29.15

CTPとdCTPは本質的には実施例1に記述したように(a)水酸化され、(b)アシルアミンと反応せられ、(c)NHS-ビオチンでビオチン化された。CTP (56.3mg, 0.1ミリモル)もしくはdCTP (59.1mg, 0.1ミリモル)がpH 5.0の0.1M酢酸ソーダバッファの20ml中に溶解せられそして酢酸水銀 (0.159gm, 0.5ミリモル)が添加された。該溶液は 50°C で4, 5時間加熱せられそれから氷上で冷却せられた。塩化リチウム (39.2mg, 0.9ミリモル)が添加せられそして該溶液は酢酸エチルで6回抽出せられた。水性層中の該ヌクレオチド生成物は冷エタノールの3倍量の添加によって沈澱せられ、該沈澱物は純エタノール、エチルエーテルで洗滌せられ、そしてそれから乾燥せられた。これら生成物は夫々AA-CTPおよびAA-dCTPの合成のために更なる精製を行なうことなくして用いられた。該水銀化ヌクレオチドはpH 5.0の0.1M酢酸ソーダバッファの中に溶解せられそして10mM (275nmにおいて92OD/ml)の濃度に調節せられた。20M

; H, 3.19; N, 7.45; P, 9.89; S, 3.41. 根拠値: C, 28.76; H, 3.35; N, 7.68; P, 9.81; S, 3.32.

pH 7.5におけるbio-dUTPとbio-UTPのスペクトル性質 (λ_{max} , 289nm ($\epsilon=7,100$); λ_{max} , 240nm ($\epsilon=10,700$); λ_{min} , 262nm ($\epsilon=4,300$)) はピリミジン環と共役する一つの外環二重結合の存在を反映している。エタノール性硫酸中のP-ジメチルアミノシンナムアルデヒドで処理するビオチン定量分析に用いられる方法 (D. B. McCormickおよびJ. A. Roth, Anal. Biochem., 34, 326, 1970)を行なった時、これらヌクレオチドはまた強い陽性反応を示す。しかしながら、これらはもはやAA-dUTPおよびAA-UTP出発物質の特徴的反応であるニンヒドリン反応を示さない。

実施例3および4

ビオチン化-CTPとビオチン化-dCTPの合成

酢酸アシルアミンストック (実施例1に述べたと同様に調製せられた)の0.6ml (1.2ミリモル)がヌクレオチド溶液 (0.1ミリモル)の10mlに添加せられ次いで1.0mlの H_2O に溶解せられたヌクレオチド溶液 (0.1ミリモル) K_2PdCl_4 (32.6mg, 0.1ミリモル)が添加された。室温で24時間放置した後、該溶液は0.45mm膜を通して戸過を行ない金属沈澱物を除去した。該戸液は5倍に希釈されそしてpH 7.5の50mM TEABによって予備平衡化されたDEAE-セファデックスA-25の50mlカラム上に負荷された。該ヌクレオチド生成物はpH 7.5の500ml緩型勾配 (0.05~0.6M)の応力によって分別された。所望の生成物は0.28と0.38M塩の間に流出する主UV吸収部分中に存在した。集められた試料はロータリーエバポレーションによって脱塩せられ、pH 4.2に0.5M酢酸トリエチルアンモニウム中に溶解され、そして最終的な精製は0.5M酢酸トリエチルアンモニウムを流出液として用いてPartisil ODS-2のカラム上でHPLCクロマ

トグラフを行うことによって達成せられた。適当な区画が集められ凍結真空乾燥せられ、そして生成物は H_2O 中に溶解せられた。該ヌクレオチドはDowex TM 50 (Na^+ 型)の存在において短時間攪拌することによって Na^+ 塩に変換せられた。

Dowex レジンを除去するための河過後、ヌクレオチドは冷エタノールの3倍量の添加によって沈降せられた。該沈降物はエーテルで洗滌されそしてそれから風乾せられた。分析結果: AA-dCTP ($C_{12}H_{17}N_4O_{13}P_3Na_4 \cdot 2H_2O$); 理論値, C, 22.29; H, 2.63; N, 8.67, P, 14.40. 根拠値 C, 22.16; H, 2.89; N, 8.77; P, 14.18. AA-CTP ($C_{12}H_{17}N_4O_{14}Na_4 \cdot 2H_2O$); 理論値 C, 21.75; H, 2.57; N, 8.46; P, 14.01. 根拠値, C, 22.03; H, 2.47; N, 8.69; P, 13.81; pH 8.0 の 0.1 M ホウ酸塩バッファー中のスペクトル性質, λ_{max} 301 nm ($\epsilon=6,400$), λ_{min} 271 nm ($\epsilon=3,950$) λ_{max} 250 nm ($\epsilon=9,700$).

AA-dCTP および AA-CTP の双方共に陽性ニ

陰性反応を示す。これら生成物の更なる構造的特徴づけは現在進行中である。

実施例 5 および 6

イミノビオチン化-UTP および イミノビオチン化-dUTP の合成

イミノビオチンハイドロブロマイドは前述したようにしてビオチンから調製された(K. Hofmann, D. B. Melville および V. du Vigneaud, J. Biol. Chem, 141, 207-211, 1941; K. Hofmann および A. E. Axelrod, Ibid., 187, 29-33, 1950)。イミノビオチンのN-ハイドロキシサクシニミド(NHS)エステルはNHS-ビオチンの合成のために先に記述された原案(H. Heitzmann および F. M. Richards, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 71, 5537, 1974)を用いて調製せられた。実施例 1 (b 部)において詳細に説明されたようにして AA-UTP (7.0 mg, 0.01

ミリモル)を示した。

AA-CTP (6.6 mg, 0.01 ミリモル) もしくは AA-dCTP (6.4 mg, 0.01 ミリモル) が pH 8.5 の 0.1 M ホウ酸ソーダバッファーの 5 ml 中に溶解せられ、そしてジメチルホルムアミドの 0.2 ml 中に溶解せられている NHS-ビオチン (3.4 mg, 0.01 ミリモル) が添加された。室温で 4 時間放置後、該試料は pH 7.5 の TEAB の 150 ml 級型勾配 (0.1~0.9 M) を流出液として用いて DEAE-セファデックス A-25 の 10 ml カラム上でクロマトグラフにかけられた。0.50 と 0.60 M TEAB 間に流出したビオチン化-CTP もしくはビオチン化-dCTP を含む区画は集められ、ロータリーエバポレーションによって脱塩せられ、そして pH 7.5 の 0.02 M トリス-塩酸バッファー中で 5 mM の最終濃度に調節された後、-20 °C で凍結された。該生成物はエタノール性硫酸中で p-ジメチルアミノシンナムアルデヒドによってビオチンに対する強い陽性反応を示すが、ニンヒドリンによるスプレー時には第一級アミンに対する

ミリモル) もしくは AA-dUTP (6.3 mg, 0.01 ミリモル) が調製せられ pH 8.5 の 0.1 M ホウ酸ソーダバッファーの 5 ml 中に溶解せられ、ジメチルホルムアミドの 0.5 ml 中に溶解せられた NHS-イミノビオチン (3.5 mg, 0.01 ミリモル) が添加された。該反応混合物は室温で 1.2 時間放置されそしてそれから pH 7.5 の 0.05 M TEAB で予備平衡化された DEAE-セファデックス A-25 の 10 ml カラム上に直接負荷された。該カラムは TEAB の 150 ml 級型勾配 (0.05~0.6 M) によって流出された。0.35 と 0.40 M TEAB 間に流出したイミノビオチン-UTP もしくはイミノビオチン-dUTP を含む区画はメタノール存在におけるロータリーエバポレーションによって脱塩せられ、 H_2O 中に溶解せられた。フリルアミン-ヌクレオチドアダクトの少量を不純分として含む該生成物はニンヒドリン試験において弱い陽性を示した。最終的な精製はアビゲン-セファローズ上の親和性クロマトグラフィーによって行われた。pH 8.5 のホウ酸ソーダバッファー中にて 0.1 M

にせられた不純生成物の区画はアビジン-セファローズの5mlカラムに適用されそして同じバッファの25mlによって洗滌せられた。カラムはそれからpH4.0の50mM酢酸アンモニウムで洗滌せられ、それは鋭いピークで所望のイミノピオチン-ヌクレオチド生成物を流出した。該ヌクレオチドは冷エタノールの3倍量の添加によって沈澱せられ、エチルエーテルで洗滌せられ、水酸化ソーダペレット上で真空乾燥せられ、-20℃のデシケーター中で保存せられた。生成物はスペクトルおよびクロマトグラフの性質のみならず元素分析によっても特徴付けられた。

実施例7および8

NAGE-UTP および NAGE-dUTP の合成

アリル(3-アミノ-2-ヒドロキシ-)プロピルエーテル、NAGEと省略されるが、アリルグリシジルエーテル(Ago)(Aldrich

0.1-0.6M)を用いてDEAE-セファデックスA-25のカラム上にクロマトグラフされた。UVスペクトルとPartisil ODS-2上の特徴的なHPLC流出線相によって判定せられるのであるが、所望の生成物を含む区画は集められ、希釈せられ、そして更にpH8.5の重炭酸アンモニウムの洗滌勾配(0.1~0.5M)を用いたDEAE-セファデックス上での再クロマトグラフィーによって精製せられた。これらの条件下において、該NAGE-dUTP(またはNAGE-UTP)の大部分が残存する不純物からきれいに分離されることが出来た。ヌクレオチドが凍結真空乾燥されそしてD₂O中に再溶解されたのみにプロトンNMRスペクトルがこの精製の段階で得られた。元素分析に対して、該生成物はソーダ塩型に変換された。典型的な分析結果は次の通り: Nage-dUTP (C₁₅ H₂₂ N₃ O₁₆ P₃ Na₄ · 2H₂O), 理論値, C, 24.99; H, 3.63; N, 5.83; P, 12.88. 実験値, C, 25.39; H, 3.71; N, 5.63; P, 12.88

Chemical Co. から得られた)から調製せられた。Ago(84ミリモル)の10mlが9M水酸化アンモニウムの50mlにゆっくり(蒸気浴中で)添加されそして該混合物は6時間室温で放置せしめられた。過剰のアンモニアが減圧ロータリーエバポレーションによって除去せられて粘りような黄色油を得た。プロトンNMRによるこの生成物の分析はそれが要求せられる構造を有していることを示した。5-水銀-dUTP(0.1ミリモル)もしくは5-水銀-UTP(0.2ミリモル)がpH5.0の0.2M酢酸ソーダバッファの2~4ml中に溶解され、使用に先立ちpH5.0に酢酸で調節されたNAGEの1.6倍モル過剰量が添加せられた。最終的な反応容量(4.3および8.4ml)は夫々4.3および4.2mMのヌクレオチド濃度を有する。K₂PdCl₄の一当量(0.1もしくは0.2ミリモル)が反応を開始するために添加せられた。室温で18時間放置の後、該反応混合物は0.45μm膜を通してろ過せられ、該試料は5倍に希釈せられ、そして酢酸ソーダの線型勾配(

実施例9

標識付けされたDNA連鎖の用途

I 核型分類

(a) 約100から200のクローンを人間遺伝子貯蔵庫から選ぶ。上記のようにしてそれらを標識付けし、そして各々のクローンについて可視的にもしくは低光レベルビデオシステムによって交配の位置を決定する。特有な連鎖遺伝子に相当するこれらのクローンに対してこれは特殊なヒト染色体中のクローン化されたDNAの位置を測定する。各々の染色体について幾つかのクローンを得る。これら標識付けされたクローンの各々は特殊な染色体を識別するために用いられることが出来る。これらはまた46個の染色体の各々を22個の常染色体対の一つもしくはX染色体もしくはY染色体であるとして識別するために結合して用いられ得る。標識付けされたクローンの一組を染色体と交配せしめることによって、クローンの該組とそれ

らの位置とが可視化され得てして特殊な色で蛍光を発するであろう。標識付けされたクローンの第二組はそれから使用せられて第二蛍光染料と反応せしめられ得る。同様の過程が何回か繰返えされ得る。かくして、もし所望なれば染色体の各々の上に異なったしかし固有な位置において細胞DNAと結び付けられている蛍光標識の幾組かを有することが出来る。これら標識は可視的もしくはコンピューター化された自動核型分類のために用いられることが出来た。

(b) 自動核型分類のために、各々の染色体上の標識付けた位置の数に相当するスポットの組を見出すことによって46個の染色体の各々の大体の位置はクローンの一組を用いて識別せられ得る。かくして染色体が更なる分析にまで手を広げるに違つかどうかを測定することがデジタル化された像のコンピューター分析によって可能となる。もしこれが手を広げるに違っているならば、各々の上の標識付けられたスポットの位置および分

染色体に対する一つとが用いられ得る。異なった色であろう該二つの標識の比率を各々の細胞において測定することによって、染色体23番の異常数を示す細胞を識別することが可能である。この手順は低光レベルビデオシステムによるスライド上で、またはレーザ賦活を用いる流動計測システムにおいてのいずれかを用いることが出来る。

III 微生物検出および識別

上記のようなDNAの固有連鎖の標識付けは個々のバクテリアの識別と計数を可能にする。DNAの特殊断片が交配されている個々のバクテリアを識別するために、感度は単一標識付けされた構造が検出される程度でなければならぬ。これは低光レベルビデオシステムおよび像のコンピューター総和を用いて、もしくは光像を強化するためのいくらかの他の装置を用いて達成され得る。流動システムはまたもし感度が充分大きくされるならば用いられ得る。もしスライド上のバクテリアが

数によって個々の染色体の各々を識別することがコンピューター分析を用いて可能となる。

蛍光スポットが各々の染色体上の固有な位置に配置され得ると云う事実を用いて、このような標識のない場合よりははるかに効果的にマニュアルもしくは自動的な核型分類のいずれかを行なうことが可能となる。

II 遺伝的不調の診断

例えば23番のような特殊な染色体に固有的に結合しているクローンを選択することによって、例えば染色体が中期において濃縮されていない場合においてすらも細胞中の特殊な染色体の複写の数を数えることが可能である。かくして三倍体染色体21の胎児期の診断のために胎児の細胞が得られた時には診断は例えば染色体が中期において濃縮されていない場合においてすらもなされ得る。もし必要とあれば、標識の二組、即ち染色体23に対して固有的である一つとそしていくらかの他の

不動化せられるならば、これらの位置は見出されかような蛍光スポットの数は数えられることが出来る。これは利用される特殊クローンで交配されるDNAを含むこれらバクテリアのすべてを計数することを提供するのである。もしクローンが特殊な系列もしくはバクテリアに対して固有であるとして選択されるならば、その系列の生物の数が数えられる。加うるに、特殊な遺伝子が識別されているいかなる抗生物質耐性も抗生物質耐性遺伝子中に含まれているDNA連鎖を探索子として用いる同様な方法において特徴付けられることが出来る。加うるに、一個またはそれ以上の抗生物質耐性遺伝子を含んでいる耐性プラスミドに対して固有的である探索子が用いられ得る。個々のバクテリアに加えて、もしそれらが小さなスポット中に位置付けせられれば故にスポット中の交配されたDNAに対して固有な全蛍光が測定され得るならば特殊系列のバクテリア細胞の集団が検出せられそしてそれらの数が定められる。この方法においては特殊DNA連鎖を含んでいる生物の数

はバクテリアの混合体において測定され得る。

第1頁の続き

特許出願人 エール ユニバーシティ

代理 大 宇 佐 見 忠 男



⑤Int. Cl.³

C 12 R 1/91

G 01 N 33/50

33/54

33/68

識別記号

庁内整理番号

6422-2G

7906-2G

6422-2G

⑦発 明 者 ペニナ・アール・ランガー

アメリカ合衆国10952ニュー・

ヨーク・モンゼイ・カレッジ・

ロード57

⑦発 明 者 アレグザンダー・エイ・ウォル

ドロップ・ザ・サード

アメリカ合衆国22901バージニ

ア・シャーロットビル・ハイド

ローリツク・ロード・デイ2663